Série E
N° 250

THESE

PRESENTEE

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE CHIMIE THERAPEUTIQUE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
(PARIS XI)

POUR L'OBTENTION

DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Kafana COULIBALY

ETUDE DU SORT D'UN ANTIPALUDIQUE DE SYNTHESE, LA CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14 CHEZ L'ANIMAL SAIN ET CHEZ L'ANIMAL IMPALUDE

Soutenue le 21 mars 1972, devant la Commission d'Examen

MM.	VALETTE	Président
	COHEN CAVIER PICHAT QUEVAUVILLIER	Examinateurs

Série E
N° 250

THESE

PRESENTEE

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE CHIMIE THERAPEUTIQUE

DE L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD
(PARIS XI)

POUR L'OBTENTION

DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Kafana COULIBALY

ETUDE DU SORT D'UN ANTIPALUDIQUE DE SYNTHESE, LA CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14 CHEZ L'ANIMAL SAIN ET CHEZ L'ANIMAL IMPALUDE

Soutenue le 21 mars 1972, devant la Commission d'Examen

MM. VALETTE — Président

COHEN
CAVIER
PICHAT
QUEVAUVILLIER — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

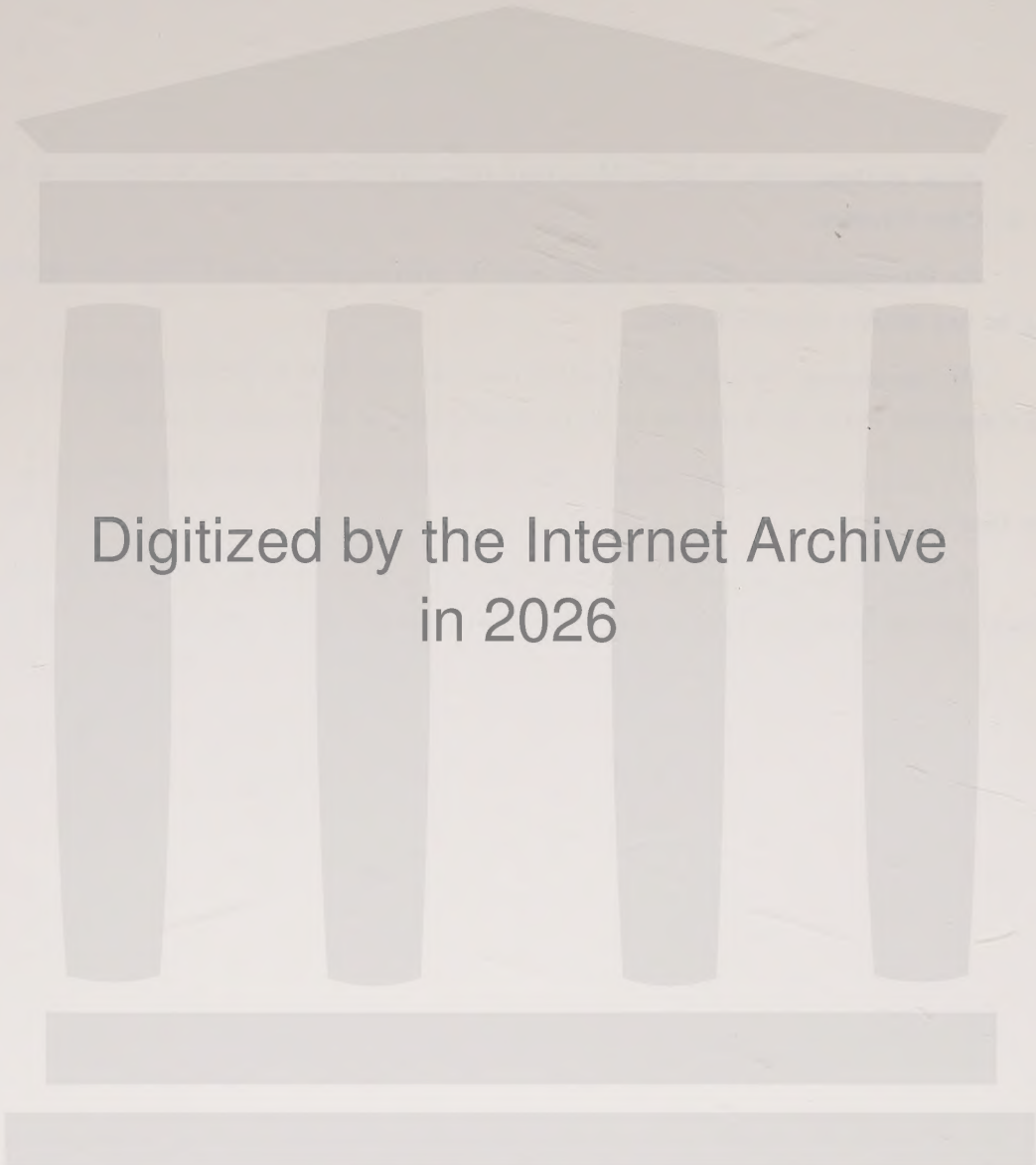
Nous dédions cette Thèse à Monsieur HOUPHOUET BOIGNY, Président de la République de Côte d'Ivoire,

En témoignage de notre gratitude pour le soutien qu'il nous a toujours apporté tout au long de nos études universitaires,

En témoignage de notre admiration pour la lutte qu'il a toujours menée en vue d'une vraie fraternité entre les hommes et de la sauvegarde de la dignité humaine,

En reconnaissance de l'exemple de courage et de réflexion qu'il donne à la jeunesse de tous les pays ;

Nous la dédions aussi à la mémoire de notre Père adoptif, GBON COULIBALY, Chef supérieur des Senoufos qui fut, durant toute sa vie, un apôtre fervent de la Paix et de la Justice.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550026_0004

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. QUEVAUVILLER A.	.....	Doyen, Président du Conseil transitoire de Gestion
M. GUIGNARD J.L.	.....	Assesseur
M. RODINEAU L.	+	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.	.....	Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A.	+	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M. JEANDEL L.	.....	Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB A.	+	Attaché d'Administration Universitaire
Mlle FRIZOL E.	.....	Attaché d'Administration Universitaire

DOYENS HONORAIRES

M. VALETTE Guillaume O +

M. MALANGEAU Pierre

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L.	.....	O +
M. FLEURY P.	.....	O +
M. PICON M.	.....	O +

PROFESSEURS

M. JANOT M.M.	O + Membre de l'Institut ...	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O + ...	Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O + ...	Matières médicales (T)
M. GUILLOT M.	O + ...	Physique (T)
M. GAUTIER J.A.	O + ...	Chimie organique (T)

Mlle	LAMBIN S.	+	Microbiologie (T)
M.	RAOUL Y.	+	Physiologie (T)
M.	COURTOIS J.	+	Chimie biologique (T)
M.	DOMANGE L.	O + ...	Chimie générale et minérale (T)
M.	TRUHAUT R.	C + Membre de l'Institut ...	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M.	MORETTE A.	+	Hydrologie (T)
M.	CAVIER R.	+	Parasitologie (T)
M.	QUEVAUVILLER A.	+	Hygiène et Education sanitaire (T)
M.	MOREAU R.	+	Pharmacie chimique (T)
M.	GERMAN A.	.....	Microbiologie (T)
M.	PIETTE M.	+	Hématologie (T)
M.	MALANGEAU P.	.....	Chimie analytique (T)
M.	GIRARD M.	+	Biochimie appliquée (T)
M.	DILLEMANN G.	.....	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M.	DEYSSON G.	+	Botanique (T)
M.	FLAHAUT J.	.....	Minéralogie (T)
M.	RENAULT J.	.....	Chimie organique (T)
M.	LE HIR A.	.....	Pharmacie galénique (T)
M.	BOUDENE C.	.....	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M.	LARUELLE P.	.....	Physique (T)
M.	ROSSIGNOL P.	.....	Pharmacodynamie (T)
M.	MANGEOT A.	.....	Pharmacie galénique industrielle (T)
M.	DELAVEAU P.	.....	Séméiologie et Pathologie générale (T)
M.	COHEN Y.	.....	Pharmacodynamie (T)
M.	RENAULT H.	.....	Physique (T)
M.	BOURDON R.	.....	Chimie analytique (T)
M.	REYNAUD P.	.....	Pharmacie chimique (T)
M.	LE MOAN R.	.....	Toxicologie
M.	POISSON J.	.....	Pharmacie galénique
M.	MICHEL R.	.....	Endocrinologie (T)
M.	LECLERC M.	.....	Hématologie
M.	PERCHERON F.	.....	Chimie biologique
M.	SAVEL J.	.....	Biologie animale
M.	DESVIGNES A.	.....	Cryptogamie et Technique bactériologique
M.	MIOCQUE M.	.....	Chimie organique.

MAITRES DE CONFERENCES

M.	PAOLETTI C.	Toxicologie (T)
M.	BORY J.	Microbiologie (T)
M.	GUIGNARD J.L.	Botanique générale (T)
M.	GOUNELLE J.C.	Physiologie (T)
M.	BINET P.	Biologie animale (T)
M.	COMBET-FARNOUX C.	Chimie organique
M.	PLAT M.	Chimie analytique (T)
Mme	PLAT M.	Législation et Déontologie pharmaceutique (T)
M.	DELACOUX E.	Pharmacie chimique (T)
M.	CAVE A.	Matière médicale (T)
M.	PUISIEUX F.	Pharmacie galénique (T)
M.	DUCHON D'ENGENIERES M.	Chimie organique (T)
M.	ADOLPHE C.	Physique (T)
M.	GUERNET M.	Chimie analytique (T)
M.	DIDRY J.	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales (T)
M.	KHODADAD P.	Chimie minérale (T)
M.	PERLES R.	Chimie biologique (S)
M.	LEMONNIER A.	Biochimie appliquée (S)
M.	YONGER J.	Chimie analytique (S)
M.	HAMON M.	Chimie analytique (S)
M.	MESTRE J.	Botanique (S)
M.	AGNERAY J.	Biologie (S)
M.	DREUX C.	Biochimie appliquée (S)
M.	RIVET J.	Chimie générale et minérale (S)
M.	ETIENNE J.	Mathématiques (S)
M.	HAZEBROUCQ G.	Physique (S)
M.	ROUSSELET F.	Biochimie appliquée (S)
M.	BOURRINET P.	Hygiène (S)
M.	SOULEAU Ch.	Chimie générale et minérale (S)
Mme	HUBERT J.	Microbiologie (délég.)
Mlle	BOURNIQUE C.	Botanique (délég.)

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M.	GESTEAU P.	+
M.	GUERIN H.	+
Mme	HARISPE M.	
Mlle	LONGUEVALLE S.	
M.	HARISPE	+

MAITRES-ASSISTANTS ET CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy	TP Pharmacie galénique 2-3è A (délég.)
M. ADAM Yves	TP Pharmacie chimique 5è A (Synthèse médicaments) (T)
M. AYMARD Pierre	ED Physiologie-Histologie (T)
Mlle BARNIER S.	Mathématiques (délég.)
Mlle BENOIS Martine	TP Botanique 2è A (délég.)
Mlle BERNARD J.	TP Bactériologie 5è A Industrie (T)
M. BESANCON Pierre	Mathématiques (S)
Mme BLANC Jeanine	ED Chimie organique 1-2è A (T)
Mme BONALY J.	ED Botanique 1 A (délég.)
Mme BOSIO Anne-Marie	TP Chimie qualitative (délég.)
M. BOURLIOUX Pierre	CES Bactériologie (délég.)
M. CAILLARD Claude	TP Pharmacodynamie 4-5 A (délég.)
M. CANAL Jacques	ED et TP Biochimie appliquée 5 A - Biologie officine (délég.)
M. CARRE Daniel	Mathématiques (délég.)
Mlle CARRERE Clotilde	TP Microbiologie 4 A (T)
Mme CENAC Jacqueline	CES Parasitologie (T)
Mme CHARDENOT P.	Chimie Biologique 3-4 A (T)
Mme CHARPENTIER M.	ED Chimie générale et minérale 1ère A (T)
M. CHERON J. Marie	TP Chimie Biologique 3-4 A (délég.)
Mlle CLAIR Geneviève	ED Matière médicale 3-5 A (T)
M. DAGRON Christian	ED Chimie générale et minérale 2 A (T)
M. DAVY Jean	CES Biochimie (délég.)
M. DEBRAY M.	Mathématiques (délég.)
Mlle DECAUDIN Marie-Thérèse	TP Parasitologie 4 A (T)
M. DELATTRE Jacques	CES Electrochimie et TP 5 A Biologie (délég.)
M. DELCOURT Alain	ED Botanique 2 A (délég.)
M. DOUSSIN Alexandre	TP Chimie analytique 5 A
Mlle DUCHENE Dominique	CES Pharmacie galénique industrielle (délég.)
Mlle DUMANT Geneviève	CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Charlotte	CES Pharmacodynamie (T)
M. ETIENNE Guy	TP Pharmacie galénique 2-3 A (T)
Mme FAURE Liliane	ED Chimie organique 1-2 A (T)
Mlle FLEURY Solange	ED Chimie analytique quantitative (T)
Mlle FOGLIETTI Marie-José	TP Chimie biologique 3-4 A (T)
M. GAIRARD Alexis	CES Contrôle médicaments (biologie) (délég.)
M. GAYRAL Philippe	TP Zoologie 1 A (délég.)
Mme BOY Françoise	Mathématiques (délég.)

M. GIRARDEAU J.F.	TP Chimie organique 5 A (synthèse organique) (délég.)
M. GOBERT Jean	TP Zoologie 1 A (S)
Mlle GOURSAT Marie-José	ED Botanique 1 A (T)
M. GROSSIORD Jean-Louis	TP Physique 1 a (délég.)
Mlle GUILLOUX Edith	TP Chimie biologique 3-4 A (S)
M. HENRY Jacques	Essais médicaments chimiques et galéniques (T)
Mme JULIEN Maud	ED Physique 2 A (T)
M. JULIEN René	ED Chimie générale 1 A (T)
Mlle JUND Yvonne	CES Microbiologie et contrôle médicaments - Microbiologie (T)
M. LALEGERIE Pierre	CES Biologie (S)
M. LAROCHE Jacques	TP 5 A - Secourisme - Hygiène Education sanitaire (T)
Mme LEDUC Yvette	TP Chimie analytique qualitative (T)
M. LEGENDRE Lucien	TP Chimie organique 2 A
Mme LEGER Nicole	Parasitologie 5 A (T)
M. LELUC Robert	CES Bactériologie (T)
M. LEMAY René	CES Législation (T)
Mme LE QUANG THUAN	TP Chimie analytique qualitative (S)
M. LEVILLAIN Pierre	ED Chimie analytique qualitative (T)
Mme LEVY Françoise	ED Botanique 2 A (délég.)
M. LIKFORMAN Joseph	ED Physique 1 A (T)
Mlle LONGEVIALLE M.	ED Botanique 1 A (T)
M. MAHUZIER Georges	TP Chimie analytique quantitative (T)
M. MANDEREAU Jean	CES Pharmacotechnie chimique (T)
M. MANET Léon	CES Biochimie (T)
M. MARTIN-FRERE H.	TP Chimie générale et minérale 1ère A (T)
M. MAUGUEN Yves	Mathématiques (délég.)
Mme MAYRARGUE Joëlle	ED Chimie organique 1-2 A (délég.)
Mlle MICHELET Annick	ED Chimie générale et minérale 2 A (T)
M. MOULIN Pierre	TP Physique 1 A (délég.)
Mme MOURY Jacqueline	TP Zoologie 1 A (S)
Mme NOTTEGHEM M.J.	ED Parasitologie 4 A (T)
M. NGUYEN Phu Lich	CES Toxicologie (délég.)
Mme PANOUSE Jacqueline	CES Microbiologie - Virologie Immunologie (T)
Mme PAOLAGGI Françoise	CES Electrochimie et TP 5 A Biologie (T)
M. PESTIS Jean	TP Anatomie, Physiologie humaine
Mme PIETTE Colette	CES Hématologie 5 A Biologie (T)
M. POULLAIN Pierre	CES Hématologie 5 A Biologie (T)
M. POUSSET Jean-Louis	TP Chimie extractive 5 A (T)
M. QUENEZ Pierre	TP Chimie générale et minérale 1 A (T)
Mme RABIANT Odile	ED Chimie analytique qualitative (S)

M. RABARON Alain	CES Pharmacotechnie galénique (délég.)
Mme ROBERT Monique	CES Immunologie - Microbiologie (T)
M. RODIER Noël	ED Physique 2 A (S)
Mlle ROLLEN Alice	TP Botanique 1 A (T)
Mlle ROUSSELET Renée	Essais médicaments végétaux (T)
Mme RUDLER Michèle	ED Chimie organique 1-2 A (délég.)
Mme SALES Nicole	TP Physiologie, Histologie (T)
Mlle SEBASTIEN Francine	TP Microbiologie 5 A (Biologie officine) (délég.)
M. SCHUSTER Jean	Essais des médicaments chimiques et galéniques (T)
Mlle SORIA Claudine	Biologie officine 5 A (S)
Mme SEILLER Monique	TP Pharmacie galénique industrielle (T)
Mlle STRUPLER Nicole	ED Chimie générale et minérale 1 A (T)
M. TOUBOUL Jean-Pierre	TP Chimie analytique 5 A (délég.)
M. TRIEU Thuong Cong	TP Chimie analytique quantitative (T)
Mlle TROUPEL Solange	TP Chimie analytique quantitative (S)
Mme VAN AMERONGEN G.	ED Chimie analytique quantitative (délég.)
M. VAYSSIERE Jean-Michel	ED Chimie organique 1-2 A (délég.)
M. VILLERS Jacques	TP Physique 2 A (T)
Mme WELBY Josette	TP Pharmacie galénique (S)

BIBLIOTHEQUE

Mlle RUYSSEN Y.	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.	.....	Conservateur
Mme COULET M.A.	.....	Conservateur
Mlle LANGLOIS C.	.....	Conservateur
N...	.....	Conservateur

	+	Chevalier
Légion d'Honneur	O	Officier
	C	Commandeur

Liste mise à jour au 15 Septembre 1970.

A Monsieur le Doyen G. VALETTE,

Professeur titulaire de la Chaire de Pharmacodynamie de la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine et de l'Académie de Pharmacie,

qui a eu la bienveillance de nous accueillir dans son laboratoire, nous a confié le sujet de cette thèse et qui, durant notre séjour en France, n'a cessé de nous conseiller, de nous guider et de nous former avec le souci de Rabelais "Science sans conscience n'est que ruine de l'âme", de Montaigne "Mieux vaut avoir tête bien faite que tête bien pleine".

Les enseignements qu'il nous a dispensés nous rendront plus utile à notre pays et son nom restera inséparable du développement des Sciences Pharmaceutiques en Afrique Francophone depuis la pose de la pierre le 5 Mars 1965 créant la première Faculté de Pharmacie à DAKAR ;

Recevez, Monsieur le Doyen, le témoignage de notre reconnaissance et de notre fidèle et respectueux attachement.

A Monsieur Y. COHEN,

Vice-Président de l'Université de Paris XI,
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Professeur à l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires de France,
Chef du Laboratoire de Contrôle des Substances Radiopharmaceutiques du C.E.A.,
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,
Membre de l'Académie de Pharmacie,

qui a eu l'obligeance de diriger cette thèse et qui, tout au long de nos travaux, n'a cessé de nous prodiguer ses encouragements, de nous guider avec pertinence et qui a bien voulu nous accepter dans son laboratoire du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay où il a su créer une atmosphère de confiance, indispensable à tout travail scientifique sérieux,

qu'il veuille bien recevoir le témoignage de notre profonde reconnaissance et l'expression de notre fidèle amitié.

A Monsieur R. CAVIER,

Professeur de Parasitologie à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Pharmacie de Paris,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

dont le concours nous a été précieux dans certaines de nos expériences,
qui a manifesté une bienveillante attention à notre égard durant notre séjour en France et qui nous a fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse,
qu'il agrée notre profonde gratitude.

A Monsieur A. QUEVAUVILLER,

Professeur d'Hygiène d'Education Sanitaire à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Pharmacie,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui a eu l'amabilité de nous recevoir dans son laboratoire pour l'acquisition de certaines techniques d'impolludation expérimentale, qui a toujours manifesté une bienveillante attention à notre égard et à notre Pays, et qui nous fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse,
qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

A Monsieur L. PICHAT,

Ingénieur-Docteur Es-Sciences,
Chef du Service des Molécules Marquées au Commissariat à l'Energie Atomique,
Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,

qui a eu l'obligeance d'accepter l'exécution de certaines expériences dans son laboratoire dont le concours nous a été précieux et qui nous a honoré de sa présence dans le Jury de cette thèse,

en témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Doyen MALANGEAU,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Doyen Honoraire de la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Pharmacie,

qui nous a fait l'honneur de nous accueillir avec bienveillance dans l'Université de Paris avec le souci de contribuer à la formation des cadres nécessaires au développement scientifique et économique de l'Afrique,

en témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle amitié.

A Monsieur TRUHAUT,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Institut,
Membre de l'Académie de Médecine,

qui a eu la bienveillance de nous accueillir dans son laboratoire, qui nous a prodigué ses précieux enseignements et, par la pratique, nous a initié aux techniques de recherches toxicologiques et sanitaires ;

En témoignage de notre profonde gratitude et de notre fidèle attachement.

A Mademoiselle LAMBIN,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Pharmacie,

qui a toujours eu une bienveillante attention à notre égard, qui nous a fait l'honneur de nous initier aux techniques d'Analyse appliquée au contrôle biologique des médicaments,

en témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur PARIS,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,
Membre de l'Académie de Pharmacie,

qui a toujours eu une bienveillante attention à notre égard, qui nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son laboratoire où il nous a initié aux techniques d'analyse appliquée au contrôle des médicaments,

en témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur ROSSIGNOL,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a toujours manifesté à notre égard une bienveillante attention,

qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

A Monsieur BOUDENE,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,

qui a toujours eu une bienveillante attention à notre égard, qui nous a fait l'honneur de nous enseigner et de nous initier aux méthodes d'étude de toxicologie industrielle,

en témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur LAMY,

Professeur à l'Institut Pasteur,

dont le concours nous a été précieux tout au long de nos travaux,

en témoignage de notre reconnaissance.

A Mademoiselle Françoise BLANC, toxicologue,

Assistante à la Faculté de Reims,

qui a toujours manifesté une bienveillante attention à notre égard,

en témoignage de notre fidèle amitié et de notre meilleur souvenir du laboratoire de Toxicologie.

A toutes les Autorités du Commissariat à l'Energie Atomique, qui nous ont fait l'honneur de nous accepter avec bienveillance dans leur Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A la mémoire de notre Mère,
A la mémoire de notre Père,
A notre femme Gisèle M. Simone,
A nos enfants et à nos frères,
A nos beaux-parents,
A nos beaux-frères,

En témoignage de notre affectueuse reconnaissance.

A la Maman Seine GBON COULIBALY,

honorable épouse de notre père-adoptif,

qui nous a témoigné de sa tendre affection maternelle tout au long de notre enfance,

Veuillez accepter l'expression de notre profonde reconnaissance, de notre fidèle attachement et l'affection de notre tendre enfance.

A Monsieur le Docteur N'DIA KOFFI,

Ministre d'Etat de la République de Côte d'Ivoire,

qui nous a fait l'honneur de défendre notre candidature à cette thèse auprès du Gouvernement, et qui, tout au long de notre séjour en France, n'a cessé de nous apporter ses conseils, son aide, sa protection, ses encouragements, son affection ;

A Madame N'DIA KOFFI qui nous a toujours témoigné de sa tendre affection maternelle,

Recevez, tous les deux, l'expression de notre profonde gratitude, de notre fidèle et affectueux attachement.

A Monsieur GLASSON,

Professeur à la Faculté de Médecine de Genève,
Laboratoire du Métabolisme des Médicaments,

A Monsieur P. BOYMOND,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Genève,

A Monsieur MIRIMANOFF,

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Genève,

qui ont toujours manifesté une attention bienveillante à notre égard,

en témoignage de nos sincères remerciements.

A Monsieur Philippe YACE,

Secrétaire Générale du P. D. C. I.,
Président de l'Assemblée Nationale de la R. C. I.,

qui nous a toujours honoré de sa bienveillante attention,

en témoignage de notre profonde gratitude.

A Monsieur COULIBALY MAMADOU,

Président du Conseil Economique et Social,

Auprès duquel nous avons toujours trouvé conseils, aide, compréhension, soutien et réconfort moral,

Veuillez accepter, Monsieur le Président, l'expression de notre profonde gratitude, de notre fidèle et affectueux attachement.

A Monsieur KONAN BEDIE,

Docteur en Sciences Economiques,
Ministre des Finances et des Affaires Economiques de la République de Côte d'Ivoire,

qui nous a toujours honoré de son concours et, auprès duquel, nous avons trouvé conseils, aide, compréhension et encouragements,

en témoignage de notre profonde gratitude, de notre fidèle amitié et du souvenir de notre vie universitaire de Poitiers.

A Monsieur BARRY BATTESTI Ange,

Professeur,
Ministre de l'Enseignement Technique et Professionnel de la République de Côte d'Ivoire,

qui nous a toujours honoré de son affection et de sa bienveillante attention et dont le concours nous a été précieux tout au long de notre vie universitaire,

en témoignage de notre profonde reconnaissance, de notre affection et du souvenir merveilleux de notre vie universitaire de Poitiers.

A Monsieur MOKEY,

Pharmacien,
Ancien Ministre,

qui nous a toujours honoré de ses encouragements,

en témoignage de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur TANON MANGONA,

Inspecteur, Directeur de la Pharmacie de la République de Côte d'Ivoire,

qui n'a cessé de nous prodiguer ses encouragements, ses conseils, son affection, qui nous apporté son soutien total qui nous a été précieux tout au long de nos travaux,

Recevez, Monsieur le Directeur, l'expression de notre profonde gratitude et de notre fidèle attachement.

A Monsieur COULIBALY Ibrahima,

Général de Brigade des FANCI,

qui nous a toujours manifesté une affection fraternelle et auprès duquel nous avons trouvé conseils, aide, compréhension, encouragements et soutien,

en témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle attachement.

A tous les enfants de GBON COULIBALY,

Chef Supérieur des Senonfos,

A tous ses Petits-Fils,

En témoignage de notre affection fraternelle, de notre fidèle attachement.

A Monsieur H. VARLET,

Docteur en Médecine,
Député à l'Assemblée Nationale de la R. C. I.,

qui nous a toujours témoigné de son affectueuse amitié et auprès duquel nous avons trouvé conseils, aide et encouragements.

Recevez, Monsieur le Député, notre profonde gratitude et notre fidèle attachement.

A Monsieur APPAGNY TANOE,

Docteur en Médecine,
Ambassadeur de la R. C. I. en France,

qui a toujours manifesté une bienveillante attention à notre égard et auprès duquel nous avons trouvé conseils, aide, coopération et compréhension,

en témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle attachement.

A Monsieur Ph. GUILLOU,

Conseiller Technique à l'Ambassade de R.C.I. en France,

qui nous a honoré de ses conseils, de son attention bienveillante, tout au long de notre vie universitaire et auprès duquel nous avons toujours trouvé compréhension et encouragements,

qu'il agrée l'expression de notre profonde gratitude et de notre fidèle amitié.

A Monsieur et Madame COULIBALY Dramane,

Médecin militaire,
Capitaine des FRANCI,

qui nous a toujours manifesté leur bienveillante affection fraternelle,

en témoignage de notre profonde reconnaissance et du souvenir de notre vie universitaire de Poitiers.

A Madame COHEN,

qui a eu la bienveillance d'apporter son aimable concours à la mise au point de la rédaction de cette thèse.

Veuillez accepter, Madame, l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Madame ROLLAND Rose-Marie,

Secrétariat de L C P du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,

qui a toujours eu une bienveillante attention à notre égard et dont le concours nous a été précieux dans tous les domaines durant notre séjour au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,

qu'elle veuille bien accepter nos sincères remerciements et l'expression de notre fidèle amitié.

A Madame EICHNER,

Secrétariat de l'Institut National des Sciences et Techniques Nucléaires de Saclay,

qui a toujours manifesté une bienveillante attention à notre égard,

en témoignage de nos sincères remerciements.

A Monsieur Albert LINDENBAUM,

Assistant au Laboratoire de Pharmacodynamie,

et à Mademoiselle Christa MARCHIER,

qui nous ont toujours apporté le réconfort moral, qui nous ont toujours manifesté une sympathie bienveillante,

qu'ils soient assurés de notre fidèle amitié.

A tous les Chercheurs du Laboratoire de Pharmacodynamie et plus particulièrement à Mademoiselle MORIN, Monsieur BOULU, Monsieur WEPIERRE, Monsieur PAULTRE, Monsieur RAPIN, Monsieur PEYROUX, Monsieur CAILLARD, Madame DUPONT, Monsieur DUPEYRON,

Tout le personnel dont Madame BLOND et Madame FOUASNON,

qui nous ont toujours manifesté leur bienveillante sympathie,

en témoignage de nos sincères remerciements.

A Monsieur MERLIN,

Pharmacien-Ingénieur,

A tous les techniciens du Laboratoire de Contrôle des Radioéléments du C.E.A. - Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, particulièrement : Madame BAUTERS, Monsieur BRUNEAU, Madame BESNARD, Monsieur FRAPPART, Monsieur VESIEZ, Madame NIOT, Mademoiselle COSTEROUSSE,

dont le concours nous a été précieux tout au long de notre séjour à Saclay,

en témoignage de nos sincères remerciements.

A tout le Laboratoire des Molécules Marquées et plus particulièrement à Monsieur HERBERT et Monsieur MESTRE, du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,

dont le concours nous a été précieux et qui nous ont toujours manifesté une bienveillante attention,

qu'ils veuillent bien accepter nos sincères remerciements.

A tous les Techniciens de la Reproduction photographique du C.E.A. - Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, dont Monsieur JEANNIN,

A tous les Techniciens du Service de dessin, dont Monsieur HANAU du C.E.A.,

dont le concours nous a été précieux,

en témoignage de nos sincères remerciements.

A tous nos Camarades du Certificat d'Etudes Supérieures de PHARMACODYNAMIE et plus particulièrement : Monsieur BRIOT, Monsieur BONE, Monsieur DURAND et Monsieur MORETTE,

dont la sympathie nous a permis de nous initier aux techniques pharmacologiques,

en témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle amitié.

A tous nos Amis du Certificat d'Etudes Supérieures de Toxicologie et d'Etudes Sanitaires, et plus particulièrement à Monsieur PHU LICH, Chef des Travaux,

qui ont toujours manifesté une bienveillante sympathie à notre égard,

en témoignage de notre fidèle amitié.

A Monsieur et Madame IDRISSA DIARRASOUBA,

A notre fidèle et inséparable cousin MAMOUROU COULIBALY et son épouse MARIAM,

A tous nos Amis,

A tous ceux qui nous ont apporté leur concours, leur soutien,

En témoignage de notre profonde reconnaissance et de notre fidèle attachement.

INTRODUCTION

"Une substance médicamenteuse ne peut agir que sur les systèmes organiques capables de se l'incorporer : tel est le principe dont depuis 25 ans je me suis efforcé d'étudier les applications", P. EHRLICH (1911). Par cette conception de l'action des médicaments sur les organismes, EHRLICH ouvrait la voie à une pharmacologie axée sur le processus de pénétration des drogues dans l'organisme, leur fixation sur les tissus, leur incorporation dans la cellule. Il abordait ce problème d'action pharmacologique des médicaments avec un tel enthousiasme, qu'il écrivit, en 1911 : "La lecture du travail de HEUBEL sur l'intoxication saturnine fit naître en moi cette conviction que la façon dont se comportent les médicaments dans l'organisme devait être d'une importance capitale pour l'établissement d'une thérapeutique rationnelle".

Le problème de la distribution d'une substance introduite dans l'organisme n'a cessé depuis lors, d'être l'objet de première importance aussi bien chez les pharmacologues, toxicologues, chimistes que biochimistes et biologistes. Beaucoup de travaux scientifiques importants furent entrepris sur les trypanosomoses, les treponemes, le mode de pénétration de la quinine chez la paramécie (1935) ou l'amibe (1938). L'aphorisme cité par EHRLICH dans son étude sur "la chimiothérapie expérimentale des spirilloses" reste le thème de nombreuses études pharmacologiques. "Corpora non agunt nisi fixata" a été explicité de la manière suivante par cet auteur : "nous voulons dire par là, pour le domaine qui nous occupe que les parasites ne peuvent être détruits que par des corps qui présentent une certaine affinité à leur égard et qui sont capables en conséquence de se fixer sur eux".

Le problème, à l'étude duquel nous nous sommes consacrés, à savoir : l'étude du sort d'un antipaludique de synthèse, la chloroquine marquée au carbone 14 dans un animal sain et impaludé, comporte trois aspects de l'action de ce composé sur l'organisme :

a - Sa répartition à l'échelle tissulaire et cellulaire ;
b - Le caractère spécifique de cette répartition ;
c - Le mécanisme de la pénétration et de la fixation dans la cellule du parasite d'une part, et dans les cellules des tissus de l'hôte parasité, d'autre part.

Bien qu'il ait depuis longtemps retenu l'attention, le problème de l'étude du sort des antipaludiques n'est pas simple ; et nous n'en voulons pour preuve que l'assertion de Ph. DECOURT

(1950) : "l'étude des antipaludiques est assurément l'une des plus complexes de la pharmacologie. Aussi, est-elle faite seulement par quelques groupes de chercheurs dont le nombre, dans le monde est extrêmement restreint".

Certes, le nombre sans cesse croissant des publications sur la chloroquine et des dérivés des 4-amino-quinoléines (TITUS et coll., 1959, K. KURODA, 1962, COHEN et coll., 1963, CHESNEY et coll., 1965 et 1967, POLET et BARR, 1969, WARING, 1970, CONCKLIN et CHOU, 1970, et tout récemment BOYD et coll., 1971, pour ne citer que quelques auteurs), tendrait à contredire cette opinion ; mais, il n'en est pas moins vrai que jusqu'ici, l'obtention de souches transmissibles de plasmodium à caractère constant n'était pas une chose facile. Ce regain d'intérêt pour l'étude des modes d'action, de la pénétration, de la fixation et du métabolisme des dérivés des 4-amino-quinoléines dans l'organisme et au niveau des cellules "sedibus et causis morborum" (EHRICH) serait dû, entre autres raisons, à l'orientation de nouvelles recherches sur la résistance de certains agents pathogènes à la chloroquine.

A la suite de recherches entreprises en 1960 au "National Institute of Health" des Etats-Unis d'Amérique, a été caractérisée une souche de P. falciparum d'origine colombienne retrouvée ensuite au Brésil et qui s'est montrée résistante à cette drogue. Des constatations analogues ont été faites par la suite (1961) sur des hématozoaires observés chez des sujets impaludés en Thaïlande, au Cambodge et en Malaisie.

L'importance de cette maladie endémique dans le Tiers-Monde a incité l'O. M. S. à porter une attention particulière aux moyens de lutte en usage. Dans la recherche de nouvelles molécules antipaludiques d'activité plus ubiquiste, on est amené à approfondir les connaissances sur les mécanismes d'action des médicaments antipaludiques préconisés en thérapeutique. Avec la possibilité qui s'offre aujourd'hui de marquer les molécules actives au moyen de radioisotopes, le pharmacologue, le toxicologue, et le biochimiste ont cherché à suivre le sort de ces drogues aussi bien au niveau du sang qu'au niveau des cellules et des organes.

En effet, le marquage des molécules est devenu une étape importante dans l'étude des processus physiques, chimiques et pharmacologiques. Ces molécules marquées jouent un rôle de plus en plus important dans l'étude du sort des substances médicamenteuses, c'est-à-dire, leur localisation envisagée du point de vue cinétique, de leur incorporation éventuelle par la cellule et par les divers organites.

Nous nous sommes servis, pour notre étude de la chloroquine marquée au carbone 14 en raison de la stabilité de cette molécule, de sa pureté radiochimique et radioactive, de sa longue période, de son rayonnement de faible énergie.

Notre étude comprend deux grandes parties :

- Première partie : Travaux antérieurs
- Deuxième partie : Travaux personnels

Nous avons subdivisé l'ensemble de notre étude en six parties :

1 - Le Plasmodium berghei en tant qu'agent pathogène expérimental ; les méthodes d'inoculation des parasites aux animaux en vue de l'impaludation ;

2 - Rappel des méthodes pharmacologiques d'étude des agents antipaludiques ;

3 - Les diverses chloroquines marquées utilisées dans notre étude ;

4 - Localisation qualitative et quantitative, tentative de détermination de la fixation de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme, au niveau de la cellule hôte et du plasmodium infestant ;

5 - Etude cinétique, du métabolisme et de l'excrétion urinaire de la chloroquine ^{14}C ;

6 - Discussion générale et conclusion.

CHAPITRE I

Il nous a paru nécessaire de rappeler au début de ce travail l'essentiel de nos connaissances sur l'agent causal du paludisme à savoir, le Plasmodium envisagé sous ses différentes espèces.

Il convient de procéder ici à une description des agents du paludisme, de leurs cycles d'évolution d'une part chez l'homme, et d'autre part, chez l'Anophèle femelle ; nous considérerons, bien entendu, les cas particuliers du Plasmodium berghei chez la Souris et chez le Rat ; nous aboutirons ainsi à la mise au point de méthodes d'impaludation des animaux d'expérience, et à la compréhension de l'action pharmacologique des antipaludiques de synthèse.

- LES PLASMODIUMS

Les Plasmodiums sont des hématozoaires. Ils furent découverts par A. LAVERAN en 1878 au cours d'autopsies de sujets morts de fièvre paludéenne à Bone (Professeur CAVIER : communications personnelles, 1972) ; c'est à partir du sang extravasé de ces cadavres qu'il mit ces organismes en évidence. Il existe plusieurs variétés de Plasmodiums qui se différencient par leurs caractères morphologiques, biologiques et épidémiologiques et leurs sensibilités aux différents agents thérapeutiques.

Diverses espèces d'hématozoaires à tropisme humain ont été plus particulièrement utilisées pour les études pharmacologiques et cliniques : Pl. falciparum, agent du paludisme tropical, Pl. vivax, parasite du paludisme subtropical et Pl. ovale plus proche de Pl. vivax, Pl. Malariae.

Parmi les hématozoaires parasites des animaux il convient de citer Pl. berghei découvert par VINCKE et LIPS (1948) chez un rongeur, le thamnomys surdaster au Congo. Des recherches se poursuivent encore au Congo, en Côte d'Ivoire, en Sierra Léone, dans le dessein de découvrir de nouvelles espèces d'hématozoaires des rongeurs plus spécifiques que celles dont disposent actuellement les laboratoires pour la sélection de nouveaux composés antipaludiques. Il existe, au sein de chaque espèce, une grande variété de souches qui se différencient par leur virulence, leur résistance à certains médicaments, leurs caractères antigéniques.

- Rappel sommaire du cycle plasmodial

Deux cycles évolutifs se succèdent dans le paludisme. Un cycle {sexué} chez l'Anophèle femelle et un cycle asexué chez l'Homme, l'animal ou l'oiseau, qui sont les hôtes intermédiaires. Si le cycle sexué chez l'Anophèle a été observé dans le paludisme humain, on n'a pas encore pu le suivre d'une façon certaine avec l'hématozoaire des animaux.

La figure I.1, résume le cycle des parasite du paludisme chez l'Homme, l'animal et l'oiseau, hôtes intermédiaires, et chez l'Anophèle femelle, l'hôte définitif. Cette figure laisse apparaître en même temps le moment le plus favorable à l'action antiparasitaire des antipaludiques.

- Le Pl. berghei et son pouvoir pathogène chez les rongeurs

Nous décrirons très sommairement dans ce qui va suivre quelques caractéristiques intéressant nos travaux pharmacologiques, sur l'agent infestant, et les symptômes du paludisme observés chez les animaux que nous avons utilisés au cours de nos expériences.

1 - Le cycle schizogonique du Plasmodium berghei est bien connu chez le rongeur Thamnomys surdaster depuis les travaux de VINCKES et LIPS, 1948. Cet hématozoaire est inoculable à la Souris et au Rat.

De nombreux travaux ont été faits sur le Plasmodium berghei en vue de son utilisation dans les essais pharmacologiques des drogues antipaludiques ; parmi ces travaux citons, ceux de GAILLARD et LAPIERRE, 1950 ; MERCADO et COATNEY, 1951.

Le cycle (asexué) et la morphologie du Plasmodium berghei ont été l'objet d'une étude approfondie de SERGENT et PONCET chez le Souris et chez le rat albinos. Sur un étalement de sang de souris impaludée, en période d'état, coloré au May-Grunwald-Giemsa, on observe :

. Des formes annulaires bleues, avec une vacuole et un noyau rouge ; ce sont les trophozoïtes qui peuvent être intraglobulaires comme l'indiquent les figures I-2 et I-3.

. Des formes oblongues à cytoplasme bleu, sans vacuole, à noyau rouge. Ce sont les trophozoïtes mûrs, peu visibles sur nos figures.

. Ces figures montrent nettement les hématies hypertrophiées par les schizontes résultant de la division, à l'intérieur du globule rouge, du noyau du trophozoïte sans division du cytoplasme.

Sur la figure I-3 on distingue les corps en rosaces provenant de l'organisation à l'intérieur du globule rouge, des cellules formées autour de chaque division nucléaire, du schizonte ; ces cellules sont les mérozoïtes. L'hématie ainsi hypertrophiée éclate et libère ces cellules qui vont de nouveau parasiter d'autres globules rouges ; et, en même temps que ces mérozoïtes, tous les métabolites de la cellule et de ses hôtes, sont déversés dans le courant sanguin.

Dans le sang, ces mérozoïtes n'évoluent pas tous de la même façon ; certains vont prendre des caractères de différenciation {sexuée} et devenir des gamétocytes qui ne jouent pas

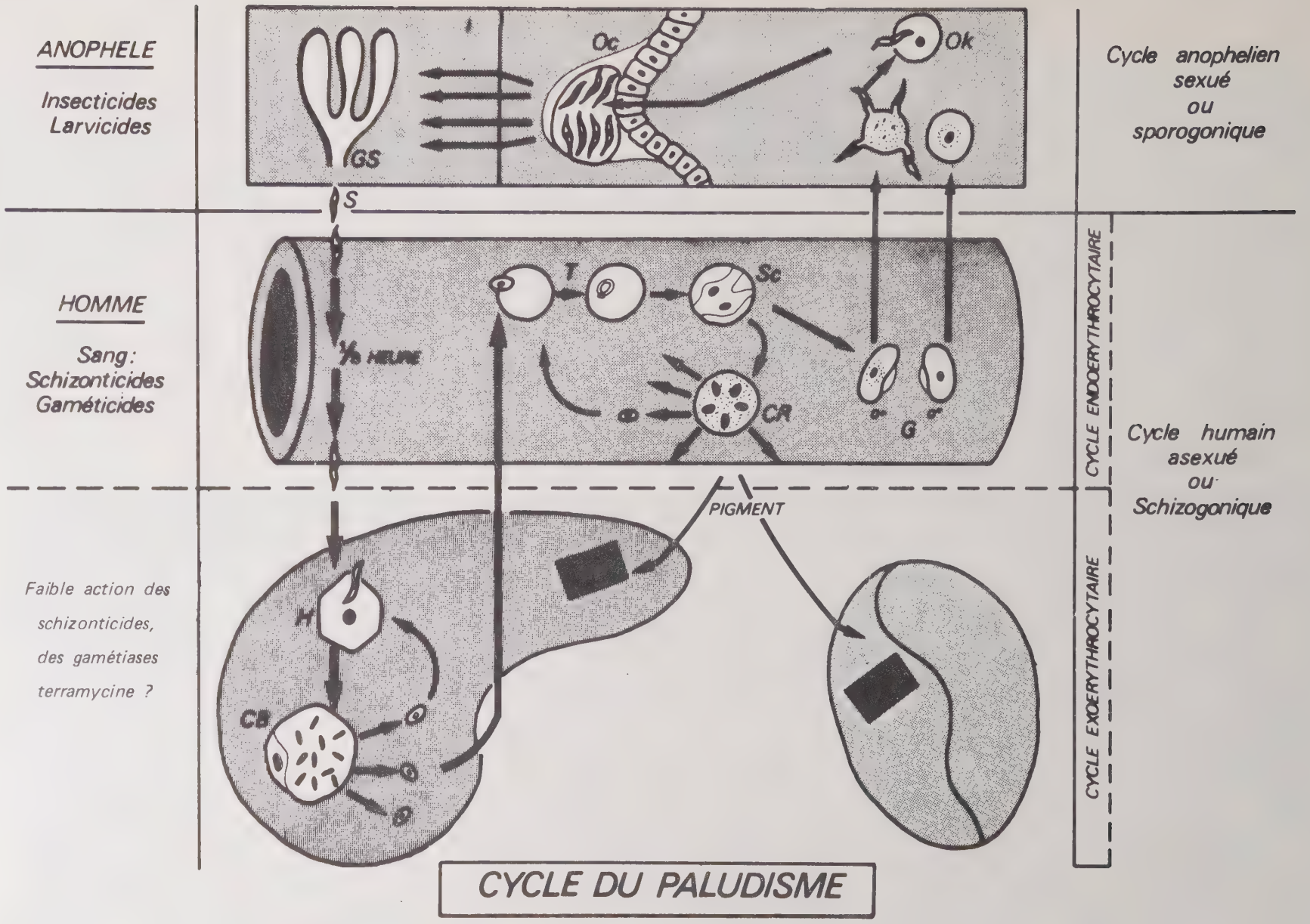
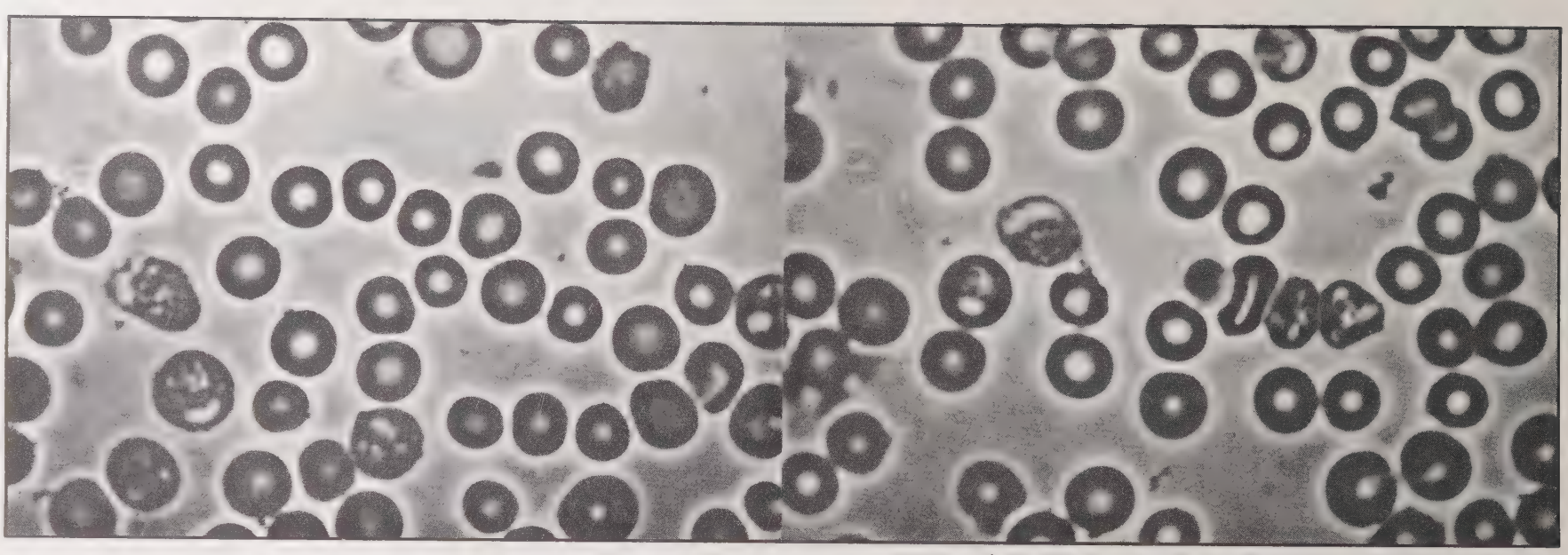

ANOPHELE
Insecticides
Larvicides
GS
Oc
Ok
Cycle anophelien
sexué
ou
sporogonique
S
HOMME
Sang:
Schizonticides
Gamétocides
½ HELVE
I
Sc
CR
G
CYCLE ENDOERYTHROCYTAIRE
Cycle humain
asexué
ou
Schizogonique
PIGMENT
Faible action des
schizonticides,
des gamétiases
terramycine ?
H
CB
CYCLE EXOERYTHROCYTAIRE
CYCLE DU PALUDISME

Figure I - 1

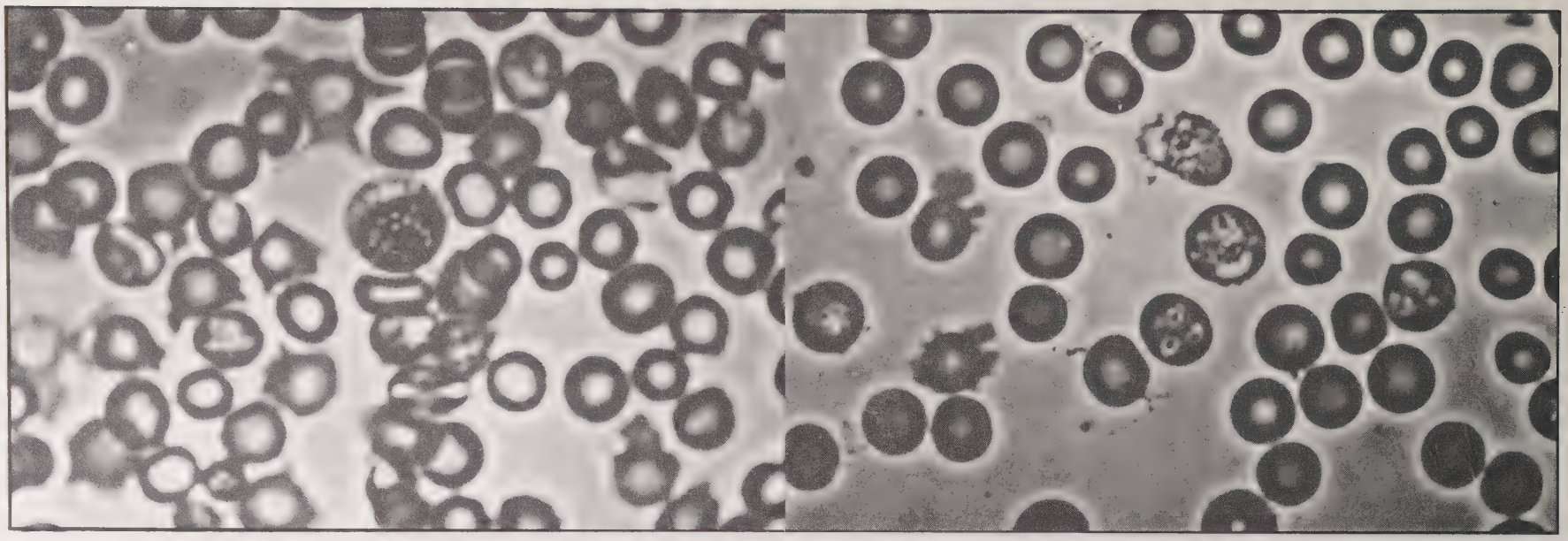


Sang d'animaux impaludés non traités à la chloroquine ^{14}C.

Numération globulaire (globules rouges) du sang en période d'état. Coloration au May-Grunwald-Giemsa.

Beaucoup de cellules (hématies) atrophiées. Quelques-unes éclatent libérant ainsi de nombreux mérozoïtes, les autres sont attaquées par de jeunes schizontes.

Figure I - 2



Sang d'animaux impaludés non traités à la chloroquine ^{14}C.

Numération globulaire (globules rouges) du sang en période d'état.
Coloration au May-Grunwald-Griemsa.

Sur cette figure, on voit nettement les corps en rosace.

Figure I - 3

de rôle pathogène pour leur hôte intermédiaire mais sont nécessaires à la diffusion de l'espèce plasmodiale ; d'autres vont parasiter de nouvelles hématies ; le cycle recommence ainsi par la transformation successive des mérozoïtes et des trophozoïtes.

Des travaux de MARTIN (1965) il résulte qu'après un certain temps d'évolution du cycle schizogonique, la multiplication de l'hématozoaire du paludisme s'arrêt par un phénomène dysgonique : le plasmodium ne peut plus se reproduire ; les hématozoaires disparaissent du sang, ils ne réapparaîtront que lors d'un autre accès de fièvre ; dans ce cas, on parle de rechute si le sujet n'est plus dans une zone endémique.

Plusieurs auteurs dont MARTIN (1965), se sont posé la question de savoir où se situaient ces parasites plasmodiaux avant leur réapparition dans le sang au moment de la rechute du paludéen ? Leurs recherches leur ont permis de mettre en évidence des formes exo-érythrocytaires de l'hématozoaire.

Il y a quelques années, on pensait que ces schizontes, ne pouvant pas se reproduire dans le sang, se rendaient dans le tissu hépatique en attendant que des conditions plus favorables fussent remplies au niveau sanguin. Toutefois, pour MARTIN (1965), les formes exoérythrocytaires, observées par QUEVAUVILLER et LOW (1955) seraient les "corps bleus" de SHORTT ; d'après MARTIN (1965), ces formes infestantes résultent du développement du sporozoïte inoculé ; il en existerait ainsi un certain nombre dans le système réticulo-endothélial à la suite de chaque inoculation. Par la suite, certains de ces sporozoïtes donneraient lieu à des ensemencements sanguins successifs, mais le passage dans le sang paraît constituer une impasse dans la survie de la souche intéressée, ou tout au moins de son caractère pathogène. La rechute serait, selon cet auteur, imputable à la migration du foie vers le sang d'une autre souche dont le temps de séjour réticulo-endothélial serait plus prolongé . Certains auteurs pensent que les trophozoïtes succèdant à cette forme intrahépatique sont capables, non seulement de parasiter les hématies, mais aussi de reconstituer des corps bleus secondaires. Pour le paludisme aviaire, ce cycle est admis ; mais il est contesté pour le Pl. vivax et le Pl. falciparum ; SERGENT et PONCET (1956) affirment n'avoir pas trouvé ce cycle dans l'évolution du paludisme que donne le Plasmodium berghei chez la Souris et chez le Rat. Notre étude pharmacologique nous a amené à observer que la concentration de chloroquine ^{14}C trouvée dans les foies des animaux parasités avec le Pl. berghei, est plus élevée que la concentration de cette drogue détectée dans les foies d'animaux sains, de même espèce, de même souche, de même poids et dans les mêmes conditions d'expérience. La différence entre ces deux concentrations a été constatée mais n'est pas significative comme le montrera la suite de nos travaux ; nous ne pouvons pas cependant soutenir ni contester l'existence de ces formes exo-érythrocytaires pour Pl. berghei. Nous dirons simplement que dans le sang, à l'éclatement des hématies hypertrophiées, on trouve des mérozoïtes, des produits de dégradation des cellules parasitées et que certaines formes parasitaires vont subir une différenciation et devenir des gamétocytes des deux sexes qui ne pourront se développer que chez l'Anophèle femelle lors d'un repas sanguin chez un paludéen ; d'autres enfin, vont reconduire le cycle (asexué) chez l'Homme jusqu'au stade dysgonique de cette variété de la souche plasmodiale.

2 - Réceptivité des rongeurs du Plasmodium berghei.

Chez les rongeurs le paludisme évolue en fonction de l'espèce animale et aussi du mode d'impaludation. SARRAZIN (1969) dans son étude du paludisme chez la Souris, observe que la durée de la période de latence est fonction du nombre de parasites administrés à l'animal. D'autres auteurs, GAILLARD et LAPIERRE (1950), FABIANI et coll. (1951), SCHNEIDER et SCHNEIDER (1950) notent que la voie d'injection du plasmodium à l'animal influe sur l'évolution de l'hématozoaire, surtout chez le Rat et la Souris. La parasitémie évolue vers la mort des animaux dans cent pour cent des cas chez les souris, et dans cinquante pour cent chez les rats, et cela, avec une rapidité étonnante si l'on injecte les hématozoaires par voie intraveineuse, intracardiaque ou intra-péritonéale ; l'évolution de la parasitémie est lente au contraire si l'on inocule les parasites par la voie intra-musculaire ou par la voie sous-cutanée ; quant à l'administration buccale, elle se montre pratiquement inefficace.

- Espèces animales réceptives au Plasmodium berghei

Les différentes espèces de rongeurs ne sont pas toutes sensibles au Plasmodium berghei. La gerbille africaine, le cobaye, sont pratiquement insensibles; d'après les travaux de SERGENT et PONCET (1955), ces rongeurs semblent manifester une immunité naturelle à son égard. DESCHIENS et LAMY (1951) ont montré que la parasitémie ne se développe chez le Lapin que si cet animal est impaludé dès la naissance. Les rats de plus de 300 g résistent à l'impaludation. Certains auteurs ont relevé une différence de réceptibilité au Plasmodium berghei suivant le sexe, les souris mâles étant plus sensibles que les femelles.

3 - Symptômes et évolution du paludisme à Plasmodium berghei chez la Souris et chez le Rat

Pour assurer une bonne conservation de la souche de Pl. berghei, nous nous sommes trouvé dans l'obligation de tenir compte des symptômes de cette maladie chez nos animaux d'expérience. Cela nous a évité des pertes importantes d'animaux et permis d'établir un programme de travail.

- La Souris et le Paludisme à Plasmodium berghei

Les travaux d'ORFILA et FABIANI (1958) et de SARRAZIN (1959), donnent de précieux renseignements cliniques sur les caractères du paludisme à Plasmodium berghei. L'évolution du paludisme chez la Souris se fait en quatre phases, et aboutit à une issue toujours fatale, quel que soit le nombre d'animaux impaludés.

Immédiatement après l'inoculation du sang paludéen à la Souris, il n'est pas possible de détecter le moindre hématozoaire dans le sang des animaux parasités. C'est la première phase qui peut durer, selon FABIANI et ORFILA (1958), quelques minutes si 5.10^6 parasités ont été injectés par la voie intrapéritonéale, une semaine si l'on s'adresse à la voie sous-cutanée avec des doses plus faibles.

La deuxième phase est celle où l'on trouve facilement les hématozoaires dans le sang périphérique. Pendant cette période comme pendant la précédente, on ne note aucun symp-

tôme pathogène. Les souris, comme les rats, ont un comportement normal. Pour certains auteurs cette période serait de quatre jours environ à la fin de laquelle le degré d'impaludation correspondrait à vingt hématies parasitées pour cent.

La période d'état succède à cette phase. Au cours de notre étude, sa durée a varié entre 4 et 6 jours chez les souris mâles de poids moyen de 20 g . Parmi les symptômes les plus visibles, nous notons une diminution du poids des animaux parasités ; ceux-ci deviennent apathiques ; les poils se hérissent ; la pupille est en myosis chez les souris ; les animaux forment des groupes serrés ; nous constatons que la parasitémie est intense car, 40 à 75 °/₀ des hématies sont parasitées. Nous avons observé, au cours de nos travaux, une mortalité de 100 °/₀ de souris impaludées au bout de quatre jours ; ceci nous a obligé à inoculer nos souris deux fois par semaine, ce qui nous a évité de nous trouver le lendemain du cinquième jour sans souche de Plasmodium berghei, toutes les souris étant mortes pendant la nuit du quatrième jour. Le coeur, le foie, les reins et surtout la rate sont les organes les plus touchés ; ils sont hypertrophiés et prennent une coloration gris noirâtre.

- Le Rat et le paludisme à Plasmodium berghei

Les rats impaludés par Plasmodium berghei ont un comportement différent des autres animaux (1969). Nous n'avons pas observé des symptômes d'impaludation pouvant s'étaler sur quatre phases comme chez les souris. Par contre, nous observons une parasitémie importante après six jours d'impaludation se traduisant par un accès parasitaire aigu ; nous avons enregistré jusqu'à 15 °/₀ de cas mortels chez les rats impaludés, au cours de nos expériences où l'inoculation des parasites à ces animaux s'est faite par voie intrapéritonéale, seule voie d'injection à laquelle nous avons eu recours. Nous avons constaté, dans ces conditions, le 15ème jour après l'inoculation, un fort degré de parasitémie atteignant 60 °/₀ d'hématies parasitées chez les rats. Cette parasitémie a diminué progressivement ; après six semaines, nous n'avons plus trouvé la moindre trace d'hématozoaires dans le sang des animaux. Les vérifications et les contrôles microscopiques ont été pratiqués conjointement avec Madame LEGER dans le Service du Professeur CAVIER.

Le symptôme le plus caractéristique chez le rat impaludé avec le Plasmodium berghei, est la splénomégalie ; la rate devient énorme par rapport à celle des animaux témoins non impaludés, de même souche et de même poids.

4 - Obtention de la souche de Plasmodium berghei. Méthodes d'impaludation des animaux d'expérience.

a) Obtention de la souche de Plasmodium berghei

La souche du Plasmodium berghei obtenue grâce à la bienveillance du Docteur LAMY de l'Institut Pasteur, est maintenue virulente par repiquage hebdomadaire sur souris blanches Swiss.

b) Méthodes d'impaludation des animaux

- Méthode d'impaludation des souris avec rat comme intermédiaire :

L'Institut Pasteur nous a fourni deux souris impaludées, en période d'état. Nous disposons de souris mâles saines de poids moyen 20 g ; ces souris proviennent du même élevage que les témoins.

- Méthodes de prélèvement du sang paludéen chez la Souris :

Avec le sang prélevé à la queue des deux souris nous avons pu impaluder dans un premier temps, une quinzaine d'animaux de plus, nous avons conservé ses deux souris souches par mesure de prudence jusqu'au contrôle de la parasitémie des animaux inoculés.

Le contrôle de la parasitémie étant effectué chez nos 15 animaux, nous avons prélevé par ponction cardiaque le sang des deux souris souches ; 0,1 ml de ce sang contient environ 125 millions d'hématies parasitées. Pour la conservation de la souche sur Rat, nous avons injecté, par voie intrapéritonéale, 0,2 ml de ce sang non dilué à un animal de 150 g. Nous avons pratiqué le prélèvement de sang paludéen tantôt à la queue quand nous faisons un repiquage de Souris à Souris, tantôt par ponction cardiaque, ou par section des carotides, lorsque nous les parasitions en vue d'une expérience prochaine.

- Méthodes de prélèvement du sang chez le Rat :

Nous avons prélevé le sang chez le Rat, soit dans le coeur, soit par ponction de l'aorte abdominale lorsque nous impaludions un nombre assez important d'animaux : 50 à 100. Nous prélevons du sang périphérique à la queue du Rat pour le contrôle de la parasitémie, ou lorsque nous impaludons 5 à 10 animaux en vue de la conservation de la souche.

Ces interventions sont facilitées en soumettant les animaux à une légère anesthésie à l'éther.

Nous faisons une numération des hématies à l'aide d'une cellule de Malassez. Des frottis de sang colorés au May-Grunwald-Giemsa permettent d'évaluer le nombre d'hématies parasitées par mm^3 de sang. Avant d'inoculer à des souris le sang prélevé chez le Rat, nous opérons une dilution dans une solution aqueuse de citrate de sodium à 2 °/₀ de façon à injecter 50 millions d'hématies parasitées sous un volume de 0,2 ml par animal. Au cours de nos expériences, nous avons utilisé nos animaux impaludés en période d'état où la parasitémie oscille entre 50 et 65 °/₀ d'hématies parasitées chez la Souris au 4ème et 5ème jour, et chez le Rat au 15ème jour d'impaludation.

- IMPALUDATION

- Passage de Plasmodium berghei de Rat à Souris

Pour que l'évolution de la parasitémie soit progressive chez la Souris, nous ne lui injectons que 50 millions d'hématies parasitées sous un volume de 0,2 ml. Au début de nos tra-

vaux, nous conservions la souche de Plasmodium berghei sur rat de 150 g et nous réinjections le Plasmodium aux souris lorsque nous devions effectuer une expérience.

Nous avons dilué au vingtième le sang prélevé chez un rat impaludé depuis une semaine ; le pourcentage était de 30 °/₀ d'hématies parasitées ; soit :

$$\frac{8\ 000\ 000 \times 30}{100} = 2,4 \text{ millions}$$

d'hématies parasitées par ml, soit 24.10^8 hématies infestées par ml de sang paludéen. La dilution au 1/20 est préparée avec une solution de citrate de sodium à 2 °/₀ préparé extemporairement.

L'inoculation est pratiquée par injection intrapéritonéale de 0,20 ml , de sang dilué aux souris d'un poids moyen de 20 g.

- Passage du Plasmodium berghei de Souris à Souris ou de Souris à Rat

Tous ces passages du Plasmodium berghei d'un animal à l'autre ont été réalisés, au cours de nos expériences, par voie intrapéritonéale.

La méthode d'inoculation de Souris à Rat et de Rat à Souris nous a paru longue, fastidieuse ; de plus, il nous est arrivé souvent de constater que le Rat n'avait plus d'hématozoaires dans son sang.

Nous avons alors adopté la méthode d'impaludation de l'Institut Pasteur qui consiste à repiquer le Plasmodium berghei sur souris, tous les 4 ou 6 jours, par voie intrapéritonéale avec du sang provenant de souris impaludées en période d'état.

- Passage du Plasmodium berghei de Souris à Rat ou de Rat à Rat

Nous injectons dans ce cas par voie intrapéritonéale 0,2 ml de sang de Rat infesté massivement (250 millions d'hématies parasitées dans 0,20 ml) directement sans dilution.

Le Rat nous a été très utile soit pour avoir une quantité suffisante de sang impaludé, soit pour la conservation de la souche.

Ainsi, pour l'étude de la cinétique de l'excrétion urinaire, de la localisation au niveau du foie et de la rate, de la chloroquine marquée au ^{14}C, nous avons utilisé des rats de 300 g impaludés à raison de 250 millions d'hématies parasitées sous 0,20 ml de sang non dilué prélevé chez des souris impaludées, en période d'état.

- Inconvénients de ces méthodes d'inoculation

Souris : Le repiquage hebdomadaire sur souris neuves est indispensable si l'on veut conserver la souche de Plasmodium berghei virulente.

En effet, aucune souris n'a survécu à l'infestation après 5 jours, durant nos expériences.

Au début de nos travaux, nous avions rencontré maintes difficultés, car le 4ème jour après l'inoculation, les souris paraissaient assez bien portantes ; et le 5ème jour, nous les trouvions toutes mortes. Ce fait résulterait, selon nous, du degré très élevé d'impaludation

puisque nous inoculons aux animaux près de 70 millions d'hématies parasitées. La Souris est très sensible à la chloroquine ; ceci nous a obligé à utiliser des doses nettement inférieures à la dose létale.

Rat : L'impaludation réussit mal chez le Rat à partir de 350 g environ ; en tout cas avec le Plasmodium berghei, les petits rats de 150 à 200 g nous ont donné davantage de satisfaction. Malheureusement, ces animaux grossissent vite et coûtent relativement cher.

- Avantages de ces méthodes d'impaludation

L'impaludation des animaux par voie intrapéritonéale a l'avantage de les parasiter progressivement relativement aux voies intraveineuse et cardiaque. Nous n'avons utilisé que la voie intrapéritonéale pour inoculer les hématozoaires aux animaux.

Souris : Les souris sont très sensibles au Plasmodium berghei, ce qui nous permet d'avoir des animaux impaludés utilisables dès le 3ème jour pour nos expériences de localisation, de concentration, de fixation de la chloroquine marquée au carbone 14 chez ces animaux et sur le Plasmodium lui-même, un des points essentiels de notre étude.

La Souris se prête bien aux coupes autoradiographiques et ne nécessite pas l'emploi d'anesthésie qui pourrait éventuellement perturber la localisation de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme des animaux.

Rat : Avec le Rat, la conservation de la souche de Plasmodium berghei est facile sur les jeunes animaux ; le repiquage de la souche se fait toutes les deux semaines.

Le contrôle de la parasitémie chez les animaux par numération des hématies suivie d'examen de frottis coloré au May-Grunwald-Giemsa, peut être précédé par la palpation de la rate qui devient énorme à partir du 20ème jour de l'impaludation par rapport à la taille de celle des animaux non impaludés.

Le prélèvement d'une quantité suffisante de sang impaludé se fait plus facilement et, le plus souvent, sans sacrifier plus d'un rat quand on souhaite parasiter une quantité suffisante d'animaux en vue d'une expérience.

CHAPITRE II

METHODES D'ETUDE DES AGENTS PHARMACOLOGIQUES ACTIFS SUR LES HEMATOZOAIRES ET SUR LES TISSUS DE L'HOTE

Au cours de ce chapitre, nous exposerons succinctement les méthodes que nous avons utilisées dans l'étude des agents pharmacologiques actifs sur les hématozoaires et sur les tissus de l'hôte avec le souci de mieux connaître le mécanisme d'action des antipaludiques au moins dans le cas particulier de la chloroquine en présence du Plasmodium berghei.

Tout d'abord, nous ferons un bref rappel des travaux antérieurs relatifs à l'étude de la fixation des substances médicamenteuses sur les tissus animaux, sur les cellules in vivo ou isolées, in vitro. Les travaux antérieurs que nous allons passer en revue ont permis de mieux orienter la plupart des recherches sur le comportement des agents chimiothérapiques. Il sera naturellement fait état de l'intérêt des molécules marquées dont l'emploi en pharmacologie n'a pris d'importance que le jour où il a été possible de synthétiser des médicaments porteurs d'un atome marqué tels que ^{131}I, ^{32}P, ^{35}S, etc.., et surtout ^{14}C.

A - Méthodes d'étude n'utilisant pas les éléments marqués

VINCK et LIPS (1948) ont étudié le cycle du Plasmodium berghei en observant des frottis de sang d'animaux impaludés, colorés au May-Grunwald-Giemsa, et en notant les différentes étapes de l'évolution de l'hématozoaire. L'étude pharmacologique, qualitative et quantitative des substances médicamenteuses, au niveau des tissus ou de la cellule, se faisait, après extraction par des solvants appropriés, par gravimétrie, colorimétrie, potentiométrie, chromatographie ou par des essais biologiques. VIRCHOW, l'un des premiers, décrivit en 1852 la présence à l'intérieur d'une cellule vivante de substances étrangères à cette dernière, observation faite sur les lésions de la lèpre lépromateuse ; ces lésions seraient celles d'une infiltration granulomateuse évolutive avec de nombreux histiocytes que cet auteur a "dénommés", cellules lépreuses et qui portent aujourd'hui son nom. Dans nos travaux personnels, nous avons, au début de nos expériences, dû utiliser des méthodes non isotopiques afin de mieux orienter notre étude pharmacologique des antipaludiques de synthèse. C'est ainsi que nous avons eu recours aux méthodes décrites par QUEVAUVILLER et LOW (1955) et SARRAZIN (1969). Nous nous bornerons à décrire ci-après les méthodes qui nous ont permis d'orienter les recherches dont les résultats seront rapportés dans les chapitres ultérieurs.

1 - Méthode utilisant l'examen microscopique de la fluorescence

La méthode que nous décrivons est celle que G. VALETTE (1935) a utilisée pour l'étude de la fixation de la quinine sur les paramécies. La quinine, en solution sulfurique, donne une fluorescence caractéristique même à des concentrations très faibles de l'ordre de $1/5.10^5$. Si l'on examine au microscope (X 500) des paramécies plongées dans ces solutions, on observe des sphères régulières qui se détachent en bleu intense sur le fond obscur de la préparation. Ces sphères sont des vacuoles digestives ; leur nombre augmente avec la concentration de la solution de quinine, et tend vers un maximum lorsque l'infusoire s'immobilise ; la fluorescence diminue ensuite d'intensité et se répartit uniformément dans tout le corps de la paramécie.

2 - Méthodes d'étude de la fixation de la quinine sur les amibes : Pénétration cellulaire et toxicité

VALETTE et ROLLE (1938) ont appliqué cette méthode à l'étude de l'action de la quinine sur les amibes avec le souci d'observer une corrélation entre la pénétration cellulaire et la toxicité de cette drogue. Comme dans le cas des paramécies, les auteurs ont observé une fluorescence bleue au niveau de certaines inclusions cytoplasmiques ou vascuolaires de l'amibe.

L'analyse des résultats a conduit à l'établissement d'une première équation (1) reliant la concentration de la solution de sulfate de quinine à la vitesse de pénétration de cette drogue dans l'amibe,

$$C^{0,56} \cdot T_I = K \qquad (1)$$

et d'une deuxième équation (2) reliant la concentration de la solution toxique et le temps au bout duquel se produit la mort de l'amibe :

$$C \cdot t_I = k \qquad (2)$$

Dans les relations (1) et (2) :

- C : concentration de la solution en milieu sulfurique de sulfate de quinine,
- t_I : temps pendant lequel le phénomène est observé,
- k et k' : sont les fonctions de C et de t
- $0,56$ = facteur de puissance de la concentration de chaque solution lié à l'espèce protozoaire utilisée.

La méthode de fluorescence a été utilisée depuis lors par ALLISON et YOUNG (1964) pour étudier le rôle des lysosomes dans la captation des drogues et des substances toxiques par les cellules. Ces auteurs ont fait porter leur étude sur les cellules vivantes obtenues par culture et mises au contact de substances en solution comme le rouge neutre, le bleu de toluidine, le bleu de méthylène, l'uroporphyrine, la vitamine A, la mépacrine, la quinine, la chloroquine, etc.. Ils ont observé que ces substances ajoutées dans les cultures des cellules vivantes, sont concentrées sur les lysosomes qui sont caractéristiques de chaque cellule et riches de phosphatase

acide. De même, SCHNEIDER et HAWKING, en 1963, ont étudié la fixation des substances trypanocides au moyen de la fluorescence que les trypanosomes acquièrent lorsqu'ils sont mis en contact avec ces médicaments en solution, et à des concentrations variables.

3 - Méthode d'étude des lésions cellulaires observées au microscope électronique dans le cas de la chloroquine

L'action toxique sur les cellules a été étudiée en 1971 par READ et BAY. La chloroquine est administrée à dose toxique et par voie orale à des porcs. Lorsque les animaux sont moribonds, on les sacrifie par saignée après anesthésie au pentobarbital sodique. Des prélèvements d'organes et de tissus sont faits immédiatement en vue de leur observation microscopique. Des coupes colorées au bleu de toluidine sont examinées au microscope optique, tandis que d'autres coupes plus minces, après traitement par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb sont observées au microscope électronique. On note la présence d'inclusions cytoplasmiques de couleur bleu - noir dont le nombre et la taille varient d'une cellule à l'autre ; ces lésions ont été observées dans plusieurs types de cellules à l'intérieur d'un même tissu. Les inclusions trouvées au niveau des neurones se montrent les plus caractéristiques. Cette méthode a permis de montrer que la chloroquine cause de larges lésions sur les cellules en fonction de l'accroissement du nombre de lysosomes contenus dans chaque type de cellules.

B - Méthodes d'étude utilisant des radioisotopes ou des molécules marquées

Si l'emploi des radioéléments occupe une place de choix dans la recherche biologique et surtout en biochimie, comme l'a si bien noté le Professeur Y. COHEN en 1957 : "il en est tout autrement en pharmacodynamie où leur utilisation reste réservée à un petit nombre de laboratoires, ceci, en raison de leur prix de revient relativement élevé", et des problèmes que pose l'introduction dans une molécule, d'un élément radioactif comme ^{131}I, ^{32}P, ^{51}Cr, ^{14}C, ^{32}S ou le ^{99m}Tc. Et pourtant l'usage de ces radioéléments, comme les molécules marquées, s'est montré très fécond depuis plusieurs années, dans l'étude de processus pharmacologiques. Beaucoup de systèmes ou de fonctions biologiques que l'on croyait simples, se sont révélés très complexes grâce à l'utilisation de ces substances radioactives. Citons l'exemple du système réticulo-endothélial dont l'étude a été entreprise par METCHNIKOFF (1884), et KÜPFFER (1899), et sur lequel, CHEVALIER (1933) a effectué des travaux importants. La complexité de ce système réticulo-endothélial a été mis en évidence grâce à l'utilisation des radiocolloïdes par beaucoup d'auteurs dont COHEN et coll. (1967). De nombreuses méthodes pharmacologiques reposent sur l'utilisation des radioéléments à l'heure actuelle, mais, nous nous bornerons à citer ici celles qui ont trait à l'étude des agents pharmacologiques actifs sur les hématozoaires du paludisme et sur les tissus de l'hôte.

4 - Méthode utilisant la chloroquine marquée au tritium pour l'étude de sa fixation par Plasmodium in vitro

La méthode que nous allons décrire a été utilisée par POLET et coll. (1969) au cours de l'exécution du travail de recherche entrepris par l'armée américaine sur le paludisme à Plasmodium malariae.

Cette méthode est fondée sur le fait que les érythrocytes parasités par le Plasmodium knowlesi, ou le Plasmodium malariae, concentrent 300 à 600 fois plus de chloroquine que les cellules non parasitées. On ajoute des doses croissantes de chloroquine tritiée à une suspension concentrée d'érythrocytes parasités par le Plasmodium knowlesi en présence de cellules non parasitées et on mesure la quantité de radioactivité captée par ces éléments sanguins.

Bien que le mécanisme de la captation ou de la concentration de la chloroquine par les cellules en général, et particulièrement par le Plasmodium de la malariae ne soit pas bien élucidé, MACOMBER et coll. (1969) pensent que l'incapacité du parasite à concentrer un taux suffisamment élevé de chloroquine, peut fournir une explication de la résistance que cet hématozoaire offre à cette drogue.

Des singes ayant été massivement parasités les uns avec les hématozoaires de Plasmodium knowlesi, les autres avec le Plasmodium malariae, on procède à un prélèvement de sang que l'on met à incuber à 37°C pendant 20 heures, afin de permettre le développement des Schizontes ; à ces cultures, et au bout de temps variables, sont ajoutées des quantités croissantes de chloroquine tritiée préalablement dissoute dans la solution de Hanks acidifiée. Les mélanges sont chauffés à + 37°C pendant un temps suffisant pour que la fixation de la chloroquine par les plasmodiums ait atteint un degré maximal. On constate alors que la captation de la chloroquine tritiée par les érythrocytes parasités au bout de 6 heures de contact s'effectue en deux phases :

a) Une phase initiale allant de 5 à 15 minutes après l'addition de la chloroquine et durant laquelle, la captation est rapide, le taux de cette captation variant entre 30 et 50 °/₀ de la quantité totale de chloroquine tritiée dosée.

b) Une seconde phase qui dure 3 heures à partir du moment de l'inoculation, au cours de laquelle la captation de la chloroquine tritiée se fait plus lentement et d'une façon graduelle en tendant vers un degré de saturation. Ces résultats concordent bien avec les conclusions de VALETTE et coll. (1935 et 1938) relatives à l'action de la quinine sur les paramécies ou les amibes d'eau douce observées au microscope à fluorescence. En effet, ces auteurs ont noté une différence de vitesse de pénétration de la quinine à l'intérieur de la cellule en fonction de l'espèce de cellule et du pH ; pour la paramécie et l'amibe, ils notent un maximum de concentration de la quinine à pH 3, 2 dans la cellule correspondant à l'intensité maximale de fluorescence bleue observée à l'intérieur de la cellule.

5 - Méthode d'étude de la localisation de la chloroquine marquée au Carbone 14 sur le Plasmodium berghei par KRAMER et MATUSIK (1971)

Cette méthode est fondée sur des expériences de lyse différentielle par la saponine à concentrations constantes des érythrocytes infestés par le Plasmodium berghei sensible à la chloroquine. Le pouvoir qu'a la chloroquine de se lier au Plasmodium avec une forte intensité paraît être en relation avec la composition de la membrane cytoplasmique du parasite. Des travaux de ces auteurs, nous retenons leurs conclusions suivantes :

1°- Les érythrocytes de souris parasités avec Plasmodium berghei sensible à la chloroquine concentrent cette drogue quand ils sont incubés in vitro avec 2.10^{-6} Mole de cet antipaludique de synthèse marqué au ^{14}C ; et ceci, jusqu'à ce qu'il s'établisse un équilibre entre la chloroquine ^{14}C libre et la chloroquine fixée par les hématozoaires. KRAMER et MATUSIK ont trouvé que cet équilibre était atteint à une concentration de 8.10^{-9} Moles de chloroquine fixée sur les hématozoaires au bout de 30 minutes d'incubation à 37°C, la lyse des érythrocytes parasités et des hématozoaires étant faite avec une solution de saponine de 0,015 °/$_{oo}$. D'autres auteurs comme FITCH (1969) ont constaté, qu'en dessous de cet équilibre la chloroquine a une interaction élevée avec les sites de liaison des hématozoaires.

2°- KRAMER et MATUSIK notent qu'il n'y a pas de différence de captation de la chloroquine par les parasites quand les érythrocytes les contenant sont lysés avec la saponine et incubés ensuite avec cet antipaludique, ou quand ces érythrocytes parasités sont d'abord traités à la chloroquine, puis lysés ensuite. Ces auteurs ont trouvé, dans les deux cas, de la chloroquine ^{14}C liés à la membrane cytoplasmique et à l'intérieur des hématozoaires.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE III

METHODES EXPERIMENTALES UTILISEES DANS NOS TRAVAUX

Dans ce chapitre, nous décrirons les méthodes que nous avons utilisées dans l'étude du sort de la chloroquine ^{14}C injectée à l'animal sain ou parasité. La plupart des mesures effectuées au cours de nos travaux concernent la détection de rayonnement β^- de faible énergie. Nous nous sommes donc adressé à des appareils comme le scintillateur liquide permettant de procéder aisément à la détection de ce rayonnement, à des méthodes comme l'autoradiographie, l'autohistoradiographie. Les performances de ces méthodes et appareils présentent une sensibilité accrue et nous ont permis d'injecter de très faibles quantités de radioéléments au cours de nos expériences, à savoir 2 µCi par souris de 20 grammes ou de 8 à 12 µCi par rat de 350 grammes. Le compteur à scintillation liquide que nous allons décrire permet plus particulièrement de détecter les particules β^- de faible énergie par des atomes tels que le tritium ^3H, le carbone 14, le soufre 35, le calcium 45, etc.., et dont les énergies sont :

^3H 0,018 MeV de période T = 12 ans
^{14}C 0,0155 MeV de période T = 5 568 ans
^{35}S 0,167 MeV de période T = 87,1 jours
^{45}Ca 0,250 MeV de période T = 152 jours.

Nous exposerons successivement l'autoradiographie, l'autohistoradiographie, la scintillation liquide et les méthodes d'étude du métabolisme et de la cinétique sanguine de la chloroquine.

I - AUTORADIOGRAPHIE

"Parallèlement aux méthodes de mesure de radioactivité s'est développée la méthode autoradiographique, par BECQUEREL (1896), LACASSAGNE et LATTES (1924), qui lui ont donné son nom. L'autoradiographie, très tôt appliquée à la biologie (BOYD, 1955), a révélé son intérêt en pharmacologie grâce aux travaux de ULLBERG en 1954. L'autoradiographie du corps entier des petits animaux donne une image immédiate de la distribution du radionuclide dans l'organisme. L'étape suivante, a été l'application de cette méthode à l'étude de la distribution des médicaments observée à l'intérieur même de la cellule, soit au microscope optique

(STUMPF et ROTH, 1965), soit au microscope électronique (ROGERS, 1967), "bien plus délicate de mise en oeuvre avec des médicaments" (COHEN, 1970). En accord avec le Professeur Y. COHEN, DROZ et LARRA (1970) ajoutent : "La radioautographie est une application de la méthode des indicateurs nucléaires qui permet à la fois la détection et la localisation des atomes radioactifs dans les structures biologiques. Cette technique offre au pharmacologue la possibilité d'étudier soit la distribution des drogues à l'échelle cellulaire, soit leur action sur le métabolisme de cellules d'un type donné, dispersées au sein d'une population hétérogène ...".

- Principe de l'autoradiographie

Le principe de l'autoradiographie est essentiellement fondé sur l'action des radiations émises par des atomes comme le tritium ^{3}H, l'iode ^{131}I, le soufre ^{35}S, le carbone ^{14}C, le phosphore ^{32}P, etc.., sur un film radiographique ou sur une émulsion nucléaire, mis à leur contact. Dans les deux cas, les cristaux de bromure d'argent se comportent comme les microdétecteurs enregistrant ces radiations.

Précisons que la détection autoradiographique d'une substance marquée dépend de plusieurs facteurs, entre autres, de ses propriétés physiques et chimiques, de l'activité spécifique du traceur de la voie d'administration, donc de la vitesse de résorption de la substance radioactive ou du traceur. L'étude détaillée de ces facteurs nous semble peu opportune dans ce travail, de nombreux rapports techniques leur ayant été consacrés (1970).

- Mode opératoire

- Application de la méthode à l'étude de la localisation des antipaludiques

1 - In toto

Pour les coupes de souris entières, nous avons utilisé la méthode d'autoradiographie de S. ULLBERG (1954) modifiée par COHEN et collaborateur (1957 et 1959). La méthode de S. ULLBERG permet d'étudier la répartition d'une substance radioactive chez l'animal sans nécessiter la séparation des tissus.

. Mode opératoire :

a) Dans la méthode proposée primitivement par ULLBERG, les animaux étaient tués par réfrigération brutale dans l'acétone refroidie à - 70°C par la neige carbonique, puis laissés 48 heures en chambre froide pour ramener les tissus à la même température que celle-ci.

Les animaux étaient ensuite débités dans cette chambre froide à - 10°C, en sections parallèles au plan sagittal. Les coupes, d'une épaisseur de 20 microns étaient collées sur un support de cellophane adhésive ; on les laissait dessécher au froid pendant 2 à 3 jours. Elles étaient ensuite appliquées étroitement avec soin, sur un film radiographique. Le noircissement ultérieur de ce film radiographique, après révélation et fixation dans des réactifs appropriés,

se montrait directement proportionnel à la radioactivité présente dans les organes considérés.

Notons simplement que l'inconvénient de cette méthode réside, entre autres choses, dans l'obligation d'opérer dans une chambre froide à - 10°C dont l'atmosphère est saturée d'anhydride carbonique. C'est une des raisons pour lesquelles COHEN et collaborateurs ont modifié cette technique en l'adaptant à l'utilisation d'un micromme à congélation par détente de CO_2 ; à cela, ils ajoutent un bac à réfrigération à - 20°C. Avec cet équipement, un laboratoire avec une chambre refroidie à - 10°C n'est plus indispensable.

b) Obtention des coupes

Après injection intraveineuse, à la Souris, de la solution de diphosphate de chloroquine marquée au carbone 14, les animaux sont sacrifiés par immersion dans l'azote liquide à - 195°C, et conservés à - 20°C dans le réfrigérateur pendant 48 heures, ce temps étant nécessaire, comme il a été dit, pour que tous les tissus de l'animal aient la même température. Après ce temps, les animaux sont retirés un par un du réfrigérateur. On retranche en deux minutes, les portions latérales, suivant deux plans de sections parallèles au plan sagittal comme l'indique la figure III-1 et l'on conserve la partie médiane de telle façon que la section sagittale passe à gauche au milieu du rein gauche, et à droite à 0,5 cm en dehors du rein droit. Le plan de section gauche du bloc est placé sur la surface plane d'une platine refroidie de telle façon que le couteau attaque en premier lieu le crâne, puis la colonne vertébrale. Les couteaux et la platine portant l'animal sont alors refroidis à - 10°C par détente d'anhydride carbonique, à des intervalles réguliers. La surface du bloc animal est égalisée au scalpel, puis à l'aide du couteau du microtome. L'épaisseur des coupes est réglée à 30 µ, on dépose deux gouttes d'éther de pétrole sur la surface plane et fraîche du bloc de l'animal pour éviter le givre ; et on applique aussitôt une bande de ruban adhésif de 15 cm de long sur 3 cm de large, l'ensemble étant à nouveau refroidi, le couteau compris. On fait pénétrer le couteau dans le bloc animal d'un mouvement lent et continu en tenant le support adhésif relevé progressivement avec la main gauche pour éviter que la coupe ne touche la face supérieure du couteau.

c) Dessication des coupes

Le ruban adhésif portant la coupe détachée, est porté, en moins de 15 secondes, dans le réfrigérateur à - 20°C sur une lame de verre de telle manière que la bande portant la coupe ne touche ce support de verre que par ses extrémités ; la coupe est située sur la face supérieure du ruban adhésif et ne doit jamais toucher la lame de verre pendant les 3 à 4 jours que dure la dessication.

d) Conservation des coupes

Après trois jours, les coupes sont retirées du réfrigérateur et placées dans un plateau enveloppé d'un sac de polythène fermé à une extrémité où elles reviennent progressivement à la température ordinaire du laboratoire à l'abri de l'humidité atmosphérique. Au bout d'une heure, les coupes sont collées sur une lame de verre et conservées séparément dans de petites pochettes en papier.

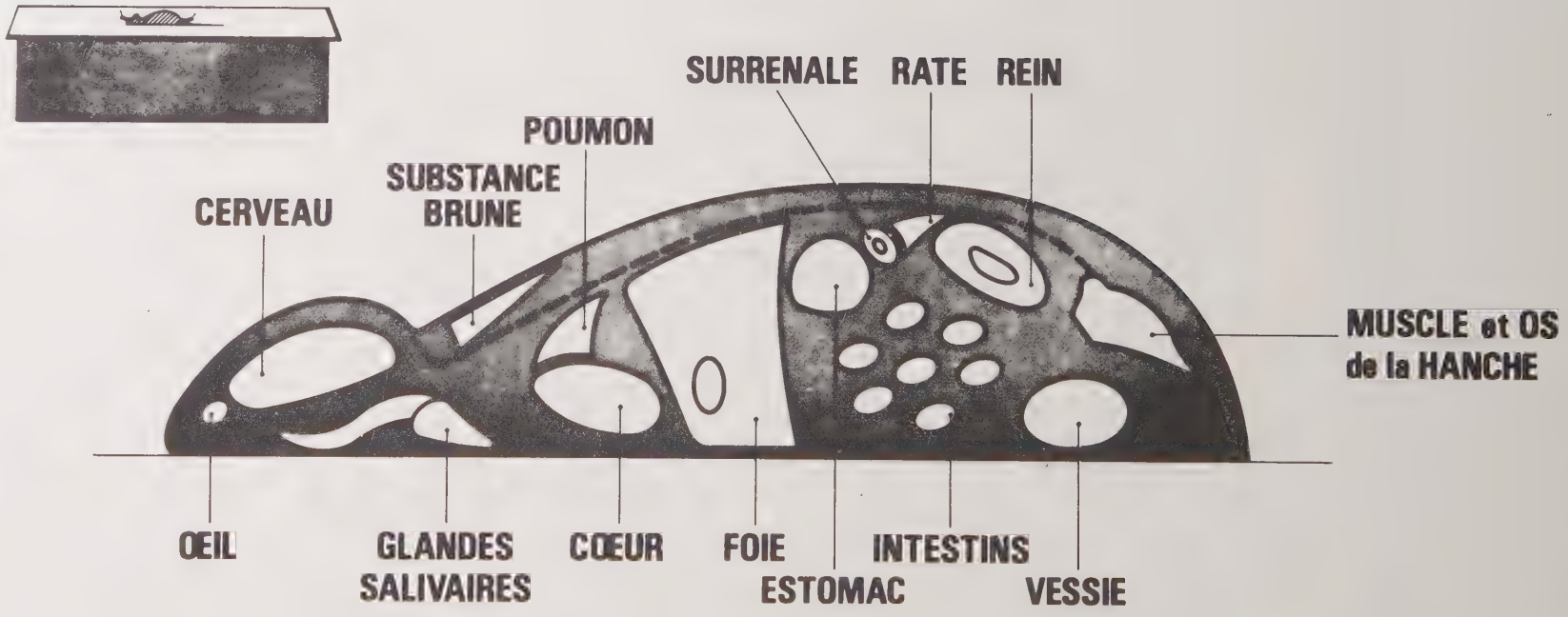

SURRENALE
RATE
REIN
POUMON
SUBSTANCE BRUNE
CERVEAU
MUSCLE et OS de la HANCHE
OEIL
GLANDES SALIVAIRES
COEUR
FOIE
ESTOMAC
INTESTINS
VESSIE

Figure III - 1

e) Autoradiographie

. Mise en contact :

Les opérations suivantes se déroulent dans une chambre noire équipée pour l'autoradiographie et éclairée en lumière rouge ou mieux en lumière verte très pâle. Les bandes adhésives portant les coupes des supports de verre sont détachées et appliquées avec leur support adhésif sur un film radiographique marque Kodak. Chaque film ainsi muni de coupes est réintroduit dans son enveloppe et remis dans une pochette de papier à fond noir. L'ensemble de ces pochettes contenant les films est enserré dans une presse enveloppée d'un sac de polythène et placé dans le réfrigérateur à - 20°C pendant 10 jours.

. Détermination du temps de contact :

A la suite d'essais préalables nous avons constaté qu'un contact de 10 jours a donné les autoradiogrammes les plus satisfaisants.

. Développement :

Après 10 jours de contact, on procède au développement des autoradiogrammes par les procédés habituels.

. Résultats :

Les résultats et les interprétations des autoradiogrammes sont groupés dans le Chapitre V.

2 - Mode opératoire de la technique autoradiographique appliquée à l'étude de la localisation des agents pharmacologiques actifs sur le Plasmodium et les tissus de l'hôte au niveau des éléments sanguins

- Couche plasmatique.
- Couche leucocytaire.
- Couche érythrocytaire.

Nous avons cherché tout d'abord à savoir comment la chloroquine se répartissait parmi les différents éléments sanguins : hématies, leucocytes et plasma. Deux méthodes s'offraient à nous : soit la méthode de séparation par sédimentation du sang et comptage du rayonnement de chaque fraction, soit la méthode autoradiographique après centrifugation.

Nous avons préféré la seconde méthode parce qu'elle est plus simple et plus pratique, et que d'autre part, nous avons rencontré des difficultés pour séparer les globules blancs situés à la surface du culot d'hématies. On trouve des indications complémentaires au sujet de cette technique dans la thèse de ROUSSELET (1967).

. Mode opératoire :

Nous injectons aux animaux d'expérience des doses de solution de chloroquine marquée au carbone 14, calculées en fonction de la DL 50 établie dans le Chapitre V. Les détails des

manipulations seront décrits dans le Chapitre IX. La plupart du temps, les injections de chloroquine marquée au carbone 14 ont été faites par voie intraveineuse.

Les animaux étant héparinés, nous prélevons 10 ml de sang par ponction de l'aorte abdominale de l'animal. Ce sang est réparti dans le petits tubes en plastique héparinés de 7 ml de volume, à raison de 5 ml par tube.

Le sang est ensuite centrifugé à 2 300 tours/minute pendant 10 minutes, puis congelé dans l'azote liquide à - 195°C et placé immédiatement à - 20°C pendant 48 heures. Après ce temps, chaque tube est retiré du réfrigérateur ; la préparation est séparée du tube et débitée en suivant la technique utilisée pour les coupes de souris.

Le plan de section doit être perpendiculaire aux plans de la sédimentation ; le couteau du microtome attaque successivement la masse de sang congelé par le plasma, les globules blancs puis les globules rouges, de telle manière que toutes les couches soient présentes sur une même coupe. Les autres opérations et le matériel utilisé sont les mêmes que dans le cas de coupes de souris in toto.

II - AUTOHISTORADIOGRAPHIE

Pour étudier la distribution de la chloroquine ^{14}C au niveau des cellules hépatiques de la rate et des divers constituants du sang, impaludés et non impaludés, au niveau du plasmodium lui-même, nous avons utilisé la méthode décrite par KOSSINET et coll. (1960) appliquée à l'hématologie et utilisant une émulsion nucléaire.

1 - Principe de la méthode

Le principe de cette méthode est le même que celui qui a été défini par l'Ecole d'ULLBERG (1954), COHEN et Collaborateurs (1963), DROZ et LARRA (1970), principe que nous avons énoncé au début de la méthode d'autoradiographie. Précisons simplement que le rayonnement émis par l'élément radioactif ou la molécule marquée impressionne l'émulsion nucléaire, en donnant un dépôt de grains d'argent noirs, ce dépôt étant proportionnel à la radioactivité de la substance détectée.

- Propriétés particulières des émulsions nucléaires :

Les émulsions ou suspensions nucléaires sont préparées spécialement pour l'enregistrement des rayons ionisants ; elles ne diffèrent pas cependant des autres émulsions photographiques, ni par leur nature, ni par leurs propriétés générales ; il est à remarquer toutefois qu'elles ont une concentration élevée en bromure d'argent que le bromure d'argent est en grains très fins et que la répartition se fait en couche épaisse.

Ces émulsions se présentent sous différents types en fonction de la nature et l'énergie du rayonnement étudié, la finesse de résolution ou la sensibilité recherchée.

2 - Mode opératoire

A - Au niveau du sang, des hématies, des leucocytes, du plasma ou du plasmodium

1°- Préparation des frottis et étalement de la gélatine nucléaire

Nous préparons des frottis avec le sang des animaux impaludés ou non impaludés ayant reçu une solution de chloroquine marquée au carbone 14. Ce sang est prélevé à la queue des souris ou des rats et la préparation des frottis se fait selon la technique classique d'étalement et de séchage à l'air libre, et à l'abri des poussières. Dans nos expériences qui seront décrites en détail dans le Chapitre VII, nous avons utilisé des lames Ilford. Ces lames sont recouvertes d'un léger film de gélatine, ce qui augmente l'adhérence de l'émulsion nucléaire, aussi bien que des éléments sanguins sur le frottis. Nous n'avons donc pas trouvé nécessaire de fixer nos préparations à l'alcool méthylique, ou de les couvrir avec de la celloïdine.

Une fois secs, les frottis sont colorés au May-Grunwald-Giemsa.

Nous transportons dans la chambre noire tous les frottis, une boîte hermétiquement fermée d'émulsion nucléaire Ilford G 4, et une plaque chauffante. Dans un godet en verre ou un tube de Borel, on dissout la gélatine nucléaire à raison de 50 g d'émulsion pour 50 g d'eau distillée, au bain-marie sur la plaque chauffante à 40°C. Toutes ces opérations se font en lumière rouge ou en lumière verte très pâle. On ne doit pas dépasser la température de 50°C ; on ne doit pas non plus prolonger le chauffage.

B - Au niveau des préparations d'organes

Les techniques de coulage de l'émulsion nucléaire fondue sur les prépatations sur lames sont nombreuses :

Certains auteurs utilisent une anse métallique pour déposer une goutte de gélatine nucléaire sur les préparations, d'autres une raclette, d'autres encore procèdent par simple trempage et c'est ce dernier moyen que nous avons utilisé. Pour cela, on marque la face portant la préparation au diamant ; on trempe ensuite très délicatement les lames portant les préparations dans la gélatine nucléaire fondue.

Une fois séchées pendant 6 à 24 heures à l'abri des poussières, les préparations sont rangées dans une boîte noire à rainures en présence d'anhydride phosphorique ou de sulfate de cuivre anhydre. Cette boîte fermée par un ruban adhésif noir est introduite dans une pochette à fond noir le tout étant entouré d'un sac de polythène. La boîte est ensuite mise dans un réfrigérateur à + 4°C. La durée de l'exposition est fonction de la période de l'élément radioactif, de la quantité de la substance radioactive injectée, enfin du gel utilisé. C'est la raison pour laquelle un essai de durée d'exposition doit précéder chaque type d'expérience.

La détection dans les organes d'un animal ayant reçu une injection de chloroquine ^{14}C est faite au bout d'un temps variable ; ici, il s'agit de foies et de rates de souris et de rats impaludés et non impaludés. Toutes ces opérations de prélèvement nécessitent le port de gants de type chirurgical.

Les animaux sont sacrifiés par un coup sur l'occiput et section des carotides. Cette façon de procéder n'abîme pas les organes. On prélève aussi rapidement que possible le foie, puis la rate, avec un bistouri très effilé ou mieux une lame de rasoir neuf, on découpe ces organes en cubes de 3 à 4 mm de côté environ. Ces fragments sont aussitôt traités par un fixateur approprié.

2°- Fixation

La fixation ou mieux la stabilisation des organes se fait en deux temps, quel que soit le fixateur utilisé. On dispose de quatre flacons en verre à large goulot à fermeture rodée dans lesquels on met le fixateur.

1er temps : On laisse tremper les fragments d'organe dans le fixateur ; ce temps varie selon sa nature.

2ème temps : Le deuxième temps est plus long. On laisse séjourner dans le fixateur des petits morceaux de foie ou de rate de 0,5 à 1 mm. Plus les parcelles d'organes sont petites, plus la surface de contact avec le fixateur est grande.

Avec le concours bienveillant de Monsieur MERLIN, Pharmacien - Ingénieur au Laboratoire de Contrôle Pharmaceutique du Département des Radioéléments, nous avons préféré utiliser le fixateur composé d'alcool absolu et d'acide acétique à raison de 3 et 1 volumes.

3°- Déshydratation

On plonge les préparations successivement dans deux bains d'alcool absolu pendant une durée de 1 h 30 chacun.

4°- Imprégnation

On utilise le toluène ou le xylène qui sont nuisibles à l'alcool absolu et la paraffine.

On prépare trois bains de toluène dans chacun desquels on laissera séjourner les préparations pendant 20 minutes.

5°- Inclusion

Les prélèvements de tissus retirés des bains de toluène et mis sur du papier Joseph pour éliminer l'excès de toluène, sont rapidement introduits successivement dans trois bains de paraffine maintenus à 60°C. On porte les béchers contenant les préparations dans une étuve à 60° pendant des temps variables selon l'organe : (1 heure pour le foie - 10 heures pour la rate).

Un deuxième temps d'étuvage à 60°C, pendant 1 heure pour le foie et 10 heures pour la rate, est réalisé dans d'autres béchers.

Au moyen de plaques de fer échancrées posées sur une plaque de verre, on réalise un moule dans lequel on verse la paraffine. Après 10 secondes, les préparations sont introduites dans chaque cube de paraffine ainsi préparée. On attend quelques minutes et on plonge le tout

dans de l'eau froide pendant 30 minutes. On peut aussi laisser le moule de paraffine se refroidir à l'air libre toute la nuit, et démouler le lendemain. Chaque bloc du prime contenant les coupes porte le nom de l'organe et le numéro de la coupe.

6°- Coupes

Après un séjour de six heures au moins hors de l'étuve, les préparations peuvent être débitées au microtome en coupes de 5 μ environ d'épaisseur. On dispose de lames Ilford couvertes de quelques gouttes de gélatine à 0,1 °/₀ sur lesquelles on dépose les coupes. La solution de gélatine à 0,1 °/₀ doit être conservée à + 4°C au réfrigérateur ou mieux préparée extemporanément pour éviter la pollution microbienne. Les lames portant les coupes sont placées sur une plaque chauffante jusqu'à ce que les plis qu'on observe sur la paraffine disparaissent. On retire alors rapidement les lames afin d'éviter les coagulations du cytoplasme. L'excès de gélatine est alors soigneusement enlevé avec du papier absorbant.

La conservation des coupes ainsi préparées se fait à l'étuve à 39°C ou à 40°C.

7°- Déparaffinage

Le déparaffinage se fait dans deux bains successifs de toluène pendant 15 minutes ; on les passe ensuite dans deux bains d'alcool absolu pendant 15 minutes chacun, puis dans l'eau courante ; le rinçage se termine avec de l'eau distillée pendant 20 minutes.

8°- Coloration

La coloration des coupes ainsi obtenues peut se faire par l'hématoxyline-eosine, le bleu de Toluidine, ou le May-Grunwald-Giemsa. La technique de coloration des coupes est un peu différente de celle que l'on emploie en hématologie. Nous exposerons les procédés de coloration au bleu de toluidine et au May-Grunwald-Giemsa que nous avons utilisés au cours de nos travaux.

Coloration de coupes de foie au bleu de Toluidine

On prépare le colorant en dissolvant 0,5 g de bleu de toluidine dans 100 ml de tampon à pH 4,2. On procède ensuite à la coloration des préparations pendant 10 minutes ; on les rince au tampon acide acétique/acétate à pH 4,2.

Les tissus ou les cellules, dans ce cas, fixent trop de colorant ; l'observation au microscope se fait mal ; on remédie à cela en différenciant par quelques gouttes d'eau distillée acétifiée à 0,1 °/₀ déposées sur les préparations jusqu'à ce que l'on voie distinctement au microscope le contour des cellules et leur contenu. En général cette différenciation se fait avec le grossissement faible ou moyen. On procède ainsi avec toutes les lames colorées ; une fois différenciées, les préparations sur lames sont rincées à l'eau distillée. Selon l'usage que l'on fait d'elles, on les monte au baume oxydé, ou on les laisse telles quelles pour la mise en contact avec la gélatine nucléaire ou tout autre film radiographique appropriée.

. Coloration des coupes de rate au May-Grunwald-Giemsa à chaud

Pour éviter tout artefact du colorant sur les préparations, on doit n'utiliser que des colorants filtrés au moment de l'emploi. On dépose la solution de May-Grunwald sur les préparations qu'on porte immédiatement à l'étuve à 37° pendant 15 à 20 minutes. On verse l'excès du colorant. Sans laver, on verse sur les préparations le colorant de Giemsa ; puis on reporte à l'étuve à 37° pendant 40 minutes. Les préparations sont ensuite lavées à l'eau distillée, puis différenciées, comme précédemment à l'eau acidifiées à 0,2 °/₀, sous le microscope ; lavées à nouveau à l'eau distillée, on les laisse ensuite sécher à l'abri de toute poussière.

Les préparations sont ensuite déshydratées dans un mélange d'alcool absolu/acétone 1/1 pendant 15 minutes, passées dans deux bains de toluène pendant 15 minutes chaque fois, puis montées ensuite au baume oxydé ; on les lute enfin au vernis cellulosique.

9°- Autohistoradiographie

L'autohistoradiographie des coupes se fait suivant la technique que nous avons déjà décrite à propos de l'utilisation de la gélatine nucléaire sur les préparations de frottis de sang.

On utilise des préparations colorées comme nous venons de le dire, et aussi des lames non colorées. On procèdera à leur coloration après contact avec la gélatine nucléaire.

III - DETECTION PAR SCINTILLATION EN MILIEU LIQUIDE

La détection ou mieux la mesure de la radioactivité par scintillation en milieu liquide rappelle l'une des plus anciennes méthodes de mesure du rayonnement nucléaire. En effet, en 1903, Sir William CROOKES observait que les particules α produisaient des scintillations visibles à l'oeil nu lorsqu'elles frappaient un écran de sulfure de zinc. Ces observations donnèrent naissance au spinthariscope utilisé par RUTHERFORD pour étudier la désintégration des substances radioactives. L'apparition du compteur Geiger-Müller éclipsa cette méthode jusqu'en 1944 où elle réapparut avec l'amélioration des photomultiplicateurs. KALLMAN (1950) l'utilisa dans l'étude de la lumière produite par le bombardement des cristaux de naphtalène avec les particules β . HOFSTADTER l'utilise en 1948 dans la mesure des rayons γ dans leurs interactions avec un cristal d'iodure de sodium activé par l'iodure de thallium. En 1950 et 1957, REYNOL et KALLMANN montrent que les substances fluorescentes en solution dans des solvants aromatiques peuvent émettre de la lumière lorsqu'elles sont soumises à des radiations ionisantes. L'application de cette méthode prit vite de l'extension dans beaucoup de domaines, et permit de résoudre "certains problèmes de transfert intermoléculaire d'énergie" qui se posaient aussi bien aux physiciens et aux chimistes qu'aux biologistes. De plus en plus, la scintillation en milieu liquide est appliquée à l'étude du métabolisme des médicaments par beaucoup de laboratoires.

- Principe de la méthode

Dans la scintillation en milieu liquide, on dispose d'une solution à faible concentration, dans un solvant cyclique, le plus souvent aromatique, d'une ou plusieurs espèces de

molécules polycycliques ou polyhétérocycliques ayant des liaisons conjuguées, donc des électrons π délocalisés. Cette solution, quand elle est soumise à des radiations électromagnétiques comme les rayons X ou γ, ou particulaire comme les rayons β, émet un spectre de photons lumineux. Il y a scintillation si la luminescence de ces photons apparaît d'une façon discontinue, ce qui implique que les excitations génératrices de cette luminescence soient suffisamment espacées les unes par rapport aux autres et dans le temps. De plus, il est nécessaire que la durée de l'ensemble des événements aboutissant à l'émission lumineuse soit brève, suivie de l'extinction de cette lumière. C'est la base du principe de la scintillation en milieu liquide.

Les sources radioactives utilisées dans cette méthode sont en général de faible intensité ; elles donnent donc des excitations dont la durée ne dépasse pas quelques nanosecondes. Donc toutes les conditions de son utilisation se trouve réunies dans le cas de nos mesures de rayon β^- de 0,155 MeV d'énergie, donc très faible.

- Mécanisme de la scintillation en milieu liquide

L'apparition d'une luminescence est la résultante de plusieurs événements qui se produisent successivement dans la solution scintillante et dans l'ensemble de l'appareil. Nous allons les résumer ici très succinctement pour la compréhension de notre propre étude. Le schéma que nous reproduisons a été proposé par P. FALLOT et M. LAINE BOSZORMENYI du Commissariat à l'Energie Atomique - Département de Biologie (Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay), 1967.

$S + I$	$\rightarrow$	S^*	Excitation de certaines molécules du solvant S par l'impulsion radioactive provenant de la source radioactive.
$S^* + S$	$\rightarrow$	$S^* + S$	L'excitation se propage au sein du solvant.
S^*	$\rightarrow$	$S + h\nu$	Emission d'un photon issue du solvant S^*.
$S^* + S$	$\rightarrow$	$2\ S$	Auto-extinction du solvant par collision.
$S^* + Q$	$\rightarrow$	$S + Q$	Extinction par transfert d'énergie à une molécule non fluorescente dans le solvant.
$S^* + F$	$\rightarrow$	$F^* + S$	Transfert de l'excitation du solvant à une molécule fluorescente F en solution.
F^*	$\rightarrow$	$F + h\nu$	Emission d'un photon $h\nu$ issu de F^*.
$F^* + F$	$\rightarrow$	$2\ F$	Auto-extinction de F^* par collision.
$F^* + Q$	$\rightarrow$	$F + Q$	Extinction de F^* par transfert d'énergie à une molécule non fluorescente Q.

Dans ce tableau résumé on a :

S = molécule du solvant ayant reçu une excitation sous forme d'impulsions,

I = intensité de l'excitation ou impulsion provenant de la source radioactive,

$h\nu$ = un photon où :

h = constante de Planck

ν = la fréquence avec laquelle l'événement se produit

Q = molécule non fluorescente dissoute dans le solvant,

F = molécule fluorescente dissoute dans le solvant.

- Mode opératoire des mesures de la radioactivité par les scintillateurs liquides

1°- Les solvants

Les dérivés du benzène sont les plus utilisés comme solvants. Nous avons surtout eu recours au toluène pur, spécialement préparé par distillations répétées à l'obscurité et ne contenant aucune impureté.

Ce toluène livré par les laboratoires Carlo Erba et Prolabo a les caractéristiques suivantes :

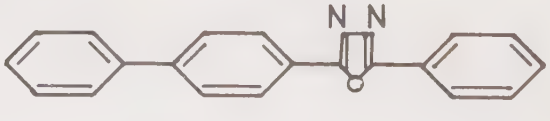
Densité à 20°C	: D_{20} = 0,866
Point d'ébullition	: PtE = 110 - 111°C
Indice de réfraction	: N_D^{20} = 1,497
Impuretés	: < 1 °/₀

2°- Molécules douées de propriétés luminescentes

Ces molécules sont caractérisées par la présence de doubles liaisons conjuguées dans leur structure et dans les noyaux hétérocycliques. Les amino-acides comme le tryptophane, la tyrosine, le phénylalanine, possèdent cette structure. Elles sont capables de devenir luminescentes tant sous l'influence des photons ultra-violets que sous celle des électrons. Certaines vitamines ou leurs dérivés, les porphyrines peuvent constituer des scintillateurs. Le terphényl de la série polyarylique ou le PPO (2, 5 diphényloxazole) de la série des oxazoles, le PDB (2 - Phényl - 5 (4) diphényl 1, 3, 4, oxadiazole), constituent les scintillateurs primaires :

Terphényl

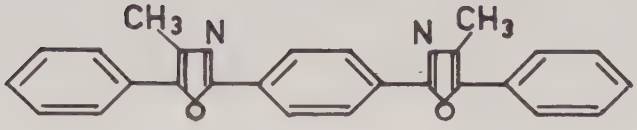
PPO



PDB

Par contre, dans ce même groupe polyarylique on trouve des composés comme le POPOP (1,4 du 2,5 phényloxazolyl benzène) ou le diméthyl POPOP, qui constituent les scintillateurs secondaires, et utilisés comme tels uniquement à cause de l'auto-extinction qui se produit pour des concentrations trop élevées.

POPOP



Diméthyl POPOP

3°- Solutions scintillantes

a) Pour les organes et substances extraites à l'état relativement pur de tout milieu

PPO	4 g
Diméthyl POPOP	100 mg
Toluène	1 000 ml

On dissout dans le toluène les substances ainsi pesées en les agitant simplement dans le solvant.

b) Solutions scintillantes utilisables pour les liquides biologiques, en particulier le sang et les urines

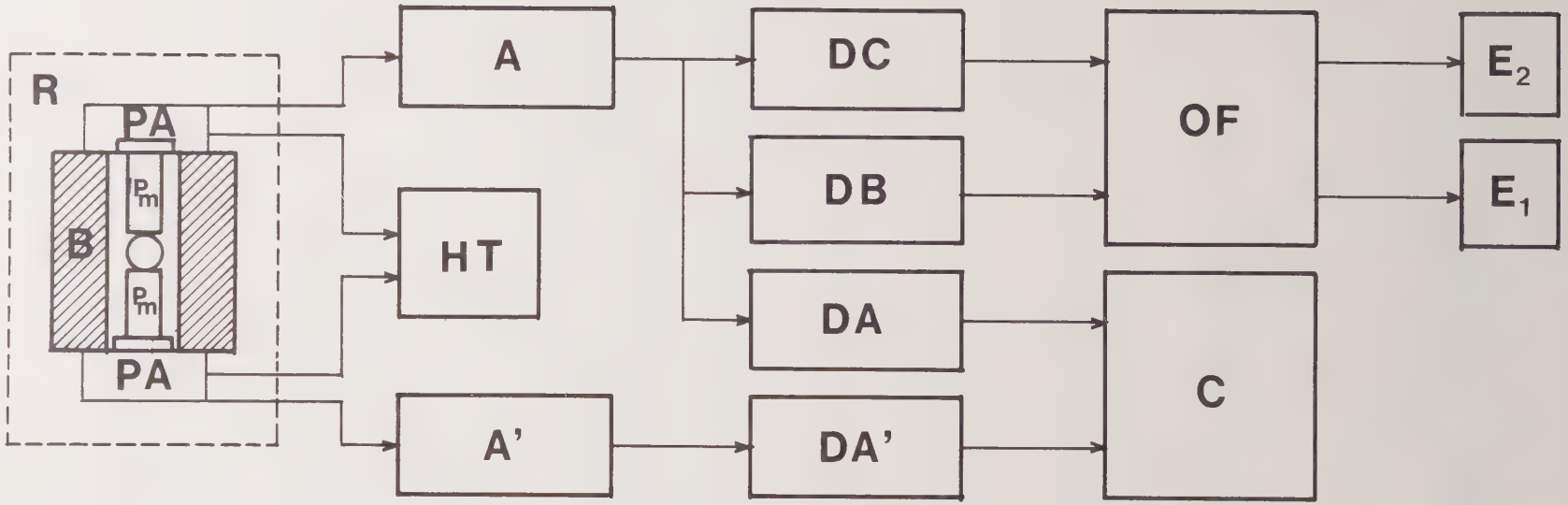
Cellosolve	5 ml
Toluène à 99 °/₀	10 ml

Ces deux liquides sont introduites dans un flacon de 20 ml contenant le liquide biologique étudié. Avant de mettre ces solutions scintillantes ainsi préparées dans chaque flacon de 20 ml, les organes prélevés sont dissous dans un solvant spécial, le toluène (livré par le laboratoire Packard). Le sang ou les urines, sont traités par un autre solvant, le cellosolve.

4°- Appareillage de mesure

La figure III-2 donne le schéma de l'appareil à scintillation en milieu liquide. Sans entrer dans les détails, disons que l'appareil fonctionne comme suit :

SCHEMA DE PRINCIPE DE L'APPAREIL A SCINTILLATION EN MILIEU LIQUIDE



R : réfrigérateur

B : blindage

Pm : photomultiplicateur

HT : haute tension

DA' - DA - DB - DC : discriminateurs

C : circuit de coïncidence

OF : circuit d'ouverture et de fermeture du passage.

E_{1-2} : échelle

Figure III - 2

Deux photomultiplicateurs explorent la solution scintillante radioactive, de telle manière que les photons lumineux frappent simultanément les deux photocathodes ; un circuit électronique à coïncidence ne laisse passer que des impulsions simultanées en dehors de celles qui viennent du mouvement propre de chacun des détecteurs.

Des sélecteurs d'amplitudes permettent de recueillir les impulsions correspondant à une énergie donnée. Ce dispositif permet de mesurer simultanément deux radioéléments introduits dans la solution scintillante, en supposant que les énergies des particules émises par les deux éléments sont assez éloignées les unes des autres ; c'est le cas de ^{14}C et ^{3}H ; ^{35}S et ^{3}H ; ^{32}P et ^{14}C. Dans les appareils du type Tricarb spectrometer de Packard actuellement très utilisés, les impulsions qui proviennent de l'isotope de faible énergie n'apparaissent que dans un seul canal, tandis que pour l'autre, on détermine le rapport de rendement dans les deux canaux. Des courbes de rendement établies en fonction des capacités de l'appareil et du radioélément donné, permettent de connaître l'activité de toute substance radioactive de faible énergie. Nous avons résumé la théorie de l'établissement de ces courbes de rendement, à l'exclusion de l'aspect mathématique de ces dernières, qui sera relaté dans le Chapitre VIII consacré à l'exécution de nos propres expériences.

Avec cet appareil, le rendement atteint 25 °/₀ du nombre absolu de désintégrations pour le tritium ; 80 °/₀ pour le carbone 14 et le soufre 35.

IV - METHODES D'ETUDE DU METABOLISME ET DE L'EXCRETION URINAIRE DES ANTIPALUDIQUES

A - Méthode de récolte des urines

On dispose de cages à métabolisme dans lesquelles on introduit les rats. La base de chaque cage s'emboîte dans un entonnoir de manière que tous les excrétas des animaux sortent par la partie effilée de l'entonnoir. A chaque cage on adapte un porte-nourriture ; pour éviter que les urines et les excréments des animaux ne se mélangent, on accroche par les ergots de l'extrémité effilée de l'entonnoir, des boules en verre dont la partie large est à 2 ou 3 mm de l'ouverture inférieure. Sous chaque boule de verre, on dispose une fiole de Fourneau de telle manière que les urines sont recueillies dans la fiole ; chaque fiole de Fourneau ainsi disposée, repose sur un plateau inoxydable où seront recueillis les excréments des animaux ; on met 0,5 ml d'acide chlorhydrique 1 N dans chaque fiole de Fourneau pour empêcher les urines de se décomposer. Pour éviter que les excréments des animaux ne viennent souiller les urines, il est recommandé d'entourer d'un papier solide, ou de tout autre système de couverture, l'ensemble d'entonnoir-plateau du dispositif de chaque animal. On ramène chaque prélèvement d'urine à un volume donné avec les eaux de lavage de la grille support, de l'entonnoir et de la fiole de Fourneau. L'ensemble du prélèvement est porté au réfrigérateur à + 4°C.

Le protocole opératoire et les résultats de nos propres travaux font l'objet du Chapitre X.

B - Méthodes d'étude des métabolites

1 - Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince est largement utilisée aujourd'hui soit pour la séparation de plusieurs substances en solution, soit pour la détection d'un produit inconnu. La théorie et la technique de la chromatographie sur couche mince ont fait l'objet de nombreux ouvrages spécialisés, entre autres, celui de Kurt RANDERATH (1964). Nous avons utilisé des chromatoplaques ayant pour phase fixe le silicagel type Brinkman F 254, luminescent non activé et nous nous sommes servi de trois solvants :

Le premier solvant est composé d'acétate d'éthyle, d'isopropanol et d'ammoniaque à 20 °/₀. (79, 15, 6).

Le deuxième de benzène, acétate d'éthyle (60, 40) ; et le troisième d'éthanol absolu, d'ammoniaque (90, 10).

Le mode opératoire et le nombre d'animaux utilisés seront décrits en détail dans le Chapitre X. Alors qu'aucun révélateur classique n'a pu détecter la moindre trace des métabolites sur les plaques, nous avons pu, grâce au service des Molécules Marquées de M. PICHAT et avec la bienveillance de Messieurs HERBERT et MAISTRE, mettre en évidence les divers métabolites ayant migrés. Les procédés d'identification utilisés ont fait appel à deux méthodes : la radiochromatographie et la photochromatographie. La radiochromatographie se fait avec le détecteur Berthold, compteur sans fenêtre ou flow-counter, en opérant de la manière suivante : l'autoradiochromatogramme sur papier ou sur plaque est déplacé lentement, à vitesse constante au-dessous d'un détecteur de radioactivité muni d'une fente, suivi d'un intégrateur et d'un enregistreur. Les résultats sont exprimés graphiquement sous forme de courbes donnant la radioactivité en fonction de la distance des taches à partir de l'origine. La vitesse de déroulement du papier d'enregistrement est la même que celle du déplacement de l'autoradiochromatogramme. Cet appareil muni d'une fente ne fournit que des mesures peu précises. Pour les mesures plus fines, on utilise le même appareil, mais sans fenêtre. Dans ce cas, pour les composés marqués au carbone 14 C, on peut détecter moins de 1 °/₀ d'impuretés. Dans l'appareil que nous avons utilisé, l'autoradiochromatogramme est placé sur un plateau qui se déplace longitudinalement sous le compteur. La mesure de la surface des "pics" fournis par l'enregistreur permet l'évaluation quantitative des métabolites.

Malheureusement, avec une précision de 0,01 µCi de l'appareil, nous n'avons pu obtenir des "pics" distincts des métabolites et du mouvement propre de l'appareil. La détection des métabolites par cette méthode n'étant pas assez sensible dans le cas de notre étude, nous avons procédé à l'observation de l'autoradiochromatogramme en lumière ultraviolette, ce qui nous a permis de révéler toutes les substances présentes sur la chromatoplaque. Les substances migrées apparaissent sous une couleur violette intense.

2 - Photochromatographie en U.V.

La méthode consiste à photographier le chromatogramme éclairé en lumière ultra-violette. Pour cela, il suffit d'adapter un appareil photographique au-dessus de l'appareil à U.V. en réglant l'intensité lumineuse au moyen d'une cellule propre à chaque appareil. L'ensemble des résultats fournis par ces techniques sera exposé dans le Chapitre X.

V - METHODE D'ETUDE DE LA CINETIQUE DE LA CONCENTRATION SANGUINE DES ANTIPALUDIQUES

Avec le concours très aimable de M. LINDENBAUN et de Mlle Christa MARCHER, nous nous sommes servi d'une technique de prélèvement de sang qui nous a permis d'obtenir des résultats que nous n'aurions pu atteindre avec la méthode de circulation extracorporelle utilisée par CHIVOT (1967) et très appropriée à l'étude de la cinétique des substances radioactives dans l'organisme animal lorsque l'énergie de rayonnement est suffisante. Avant de décrire la technique que nous avons utilisée, nous résumons rapidement la méthode de la circulation extracorporelle, ceci dans le but de faire ressortir les points qui les différencient.

- Principe de la méthode de la circulation extracorporelle

Le principe de cette technique consiste à injecter à un animal la solution de substance radioactive au moyen d'une canule ou d'un cathéter introduit dans la veine jugulaire droite ; la carotide gauche porte un autre cathéter dont une partie est enroulée en huit spires autour d'un tube à hémolyse, et à 1 cm du fond de ce dernier ; un détecteur approprié à l'énergie du rayonnement émis par la substance radioactive injectée à l'animal d'expérience, permet d'évaluer la concentration du produit radioactif en circulation dans l'organisme de l'animal. Cette concentration de la substance radioactive est enregistrée sur papier. En analysant la courbe exponentielle obtenue on peut en déduire les relations entre la concentration de cette substance, le temps d'observation et les caractéristiques propres à l'élément radioactif ou à la molécule marquée dans le milieu biologique considéré.

Avec la chloroquine marquée au carbone 14 émetteur β^- de faible énergie, soit environ 0,155 MeV, nous n'avons pas pu obtenir de résultats satisfaisants avec cette méthode de circulation extracorporelle. Sur les conseils de M. LINDEMBAUM nous avons alors eu recours à une technique de prélèvement qui nous a permis d'étudier la cinétique de la concentration sanguine de la chloroquine ^{14}C.

- Technique

On anesthésie les animaux à l'uréthane (1, 25 g/kg) par injection intra-musculaire ; on introduit un cathéter n° 4 dans la veine du pénis et on place un autre cathéter n° 4 dans le bout central de l'une des carotides communes dont on ligature le bout périphérique à direction encé-

phalique. On injecte ensuite par le cathéter veineux 0,2 ml d'héparine, l'animal étant maintenu à 37°. On recueille alors des volumes égaux de sang à des temps variables dans des tubes à hémolyse héparinés. On prend la précaution de laisser s'écouler deux à trois gouttes de sang avant chaque prélèvement de manière à vider le cathéter du sang qu'il contenait. Avec le compteur à scintillation liquide, on détermine, sur 100 µl de sang, la quantité de la radioactivité en circulation en fonction du temps.

Pour compenser les pertes de sang, on injecte à l'animal, et par la veine du pénis une quantité adéquate de sérum physiologique hépariné. On trouvera dans le Chapitre XI les résultats et les conclusions auxquels nous a amené cette méthode d'étude.

CHAPITRE IV

LES DIVERSES MOLECULES MARQUEES AU CARBONE 14 ET A L'IODE 131 : LEUR STABILITE, LEUR ANALYSE RADIOCHIMIQUE

Le marquage d'un médicament est une opération délicate qui doit être réalisée en tenant compte de plusieurs caractéristiques de l'élément radioactif à introduire, à savoir :

- la stabilité de la liaison entre cet élément et le reste de la molécule dans le milieu biologique,
- la radioactivité de cet élément,
- l'activité totale que l'on peut en obtenir,

l'activité spécifique permettant la détection précise de très faibles quantités de métabolites. Dès lors, on comprend l'importance du contrôle permanent des composés marqués depuis le produit de départ jusqu'au produit définitif, et durant la conservation jusqu'au moment de l'utilisation.

Nous allons examiner quelques aspects du contrôle de la chloroquine marquée au carbone 14 et de la chloroquine marquée à l'iode 131.

I - CHLOROQUINE MARQUEE A L'IODE 125 ET L'IODE 131

Les molécules marquées au carbone sont d'un emploi limité à cause de l'auto-absorption des rayons β et de la difficulté que présente leur détection par comptage externe. Ce sont là les raisons pour lesquelles nous n'avons pu observer la localisation du produit au scintigraphe "scanner", ni utiliser la technique directe de la circulation extracorporelle pour l'étude cinétique de la chloroquine avec les détecteur du type compteur à cristal creux. L'utilisation de ces compteurs nous aurait contraint à utiliser de fortes doses de radioactivité, donc des quantités notables de chloroquine ^{14}C ; or, vu le prix de revient des molécules marquées au carbone 14, les laboratoires de recherches ne peuvent utiliser que de petites quantités de ces substances radioactives. Quand il s'agit d'étudier pharmacologiquement une substance marquée au carbone 14 sur les animaux de laboratoire, il n'y a pratiquement pas de difficultés dans la détection de faibles quantités de radioactivité au moyen de compteurs comme les scintillateurs en milieu liquide, de Berthold ou par autoradiographie, in toto, sur les tissus séparés ; mais, il n'en est plus de même, quand ces composés sont utilisés à des fins diagnostiques chez l'Homme. Les chimistes organiciens et les utilisateurs des radioéléments se sont donc orientés vers l'emploi d'émetteurs γ ; et suivant la remarque de BLANQUET (1970) : "l'utilisation de molécules

marquées au moyen d'émetteurs γ et l'examen par caméra à scintillation, ont permis la réalisation de substantiels progrès, et de la mise au point d'une méthode de scintigraphie oculaire". L'iode 125 et l'iode 131 se sont révélés des émetteurs gamma intéressants. La chloroquine a été marquée avec ces deux radioéléments.

Bien que la préparation de la molécule quinoléique et le marquage par différentes méthodes au moyen de ces deux isotopes relèvent du chimiste et restent le rôle du laboratoire de production des radioéléments, nous rappellerons très brièvement le principe de ces méthodes de préparation. On utilise l'iode 125 comme l'iode 131 en milieu aqueux. Les utilisateurs préfèrent la chloroquine marquée à l'iode 131, l'iode 125 ne conduisant pas à une bonne visualisation avec la caméra. Le Service de Production des Radioéléments du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, avec la bienveillance de MM. HENRY, BOURDOISEAU et collaborateurs, nous a fourni à plusieurs reprises, de la chloroquine marquée à l'iode 131 qu'il a dénommé "iodoquine" (1968). La préparation de cette iodoquine se fait comme suit : La chloroquine inactive est dissoute dans une solution tampon. Au moyen d'une burette, on ajoute goutte à goutte à cette solution en agitant, un mélange iodant constitué par une solution aqueuse d'iodure de sodium radioactif, en milieu chlorhydrique. La purification de l'iodoquine obtenue s'effectue sur colonne de résine. Le contrôle de cette purification est faite en appliquant à cette préparation iodée, les méthodes décrites précédemment (Chapitre III).

Nous donnons ci-après quelques détails complémentaires.

1 - Contrôle de la pureté radiochimique de l'iodoquine 131

Le contrôle se fait par chromatographie ascendante sur papier AE 81 avec le citrate de sodium 0,25 M comme solvant, la durée de migration étant de 1 h 30. On fait ensuite une autoradiochromatographie, méthode qu'utilise le laboratoire du contrôle pharmaceutique des radioéléments du Professeur COHEN du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay ; le Service de Production utilise plutôt l'électrophorèse pour évaluer le taux des iodures en tant qu'impuretés marquées et celui de l'iode organique. Les deux services utilisent la chromatographie en couche mince pour déterminer le taux de l'iodoquine, dans un solvant constitué par l'acétone, l'ammoniaque concentrée, l'eau distillée (45, 35, 20), la chromatoplaque étant le Kieselgel F 254. Le produit qui nous a été fourni contenant 1 °/₀ environ d'iodure radioactif, 99 °/₀ d'iode organique radioactif, 10 °/₀ d'impuretés. Le produit fini se présente sous forme d'une poudre blanche insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool éthylique.

2 - Stabilité de l'iodoquine marquée à l'iode 131

L'iodoquine ^{131}I, comme sa solution aqueuse quand elle est sous forme de sel, est restée stable chimiquement durant les contrôles effectuées au bout de 15 jours. La période radioactive étant de 8 jours, nous pouvons dire que ce produit reste stable dans les conditions de son utilisation médicale. A cause de ces 10 °/₀ d'impuretés que ce produit renferme, nous avons trouvé peu opportun de l'utiliser dans l'étude pharmacologique des antipaludiques de synthèse.

Nous ne nous sommes donc servi que de la chloroquine marquée au carbone 14. D'autre part, la production de l'iodoquine n'est pas régulière, aussi ne pouvions nous pas déterminer la DL 50 avant d'établir les doses à injecter à nos animaux d'expérience comme nous l'avons fait pour la chloroquine ^{14}C.

II - CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14

Dans ce paragraphe, nous rappellerons très succinctement le schéma de la synthèse de la chloroquine marquée au carbone 14 pour mieux comprendre le sens du contrôle de ce produit radioactif.

Le carbone 14 est obtenu en irradiant dans les réacteurs, l'azote 14 sous forme de nitrure de baryum au moyen d'un faisceau de neutrons rapides ; la réaction est du type ^{14}N (n, p) ^{14}C. Il y a capture de neutrons incidents qui acquièrent une charge positive pour se transformer en protons à l'intérieur du noyau. Cela aboutit à la formation du carbone 14, isolé sous forme de $Ba\,^{14}CO_3$. C'est à partir de $Ba\,^{14}CO_3$ ou du $^{14}CO_2$ que le chimiste-organicien doit élaborer la chloroquine ^{14}C. Les renseignements dont nous avons pu disposer pour la rédaction de cette partie de notre travail, les étapes de la synthèse de la chloroquine ^{14}C réalisée au Service des Molécules Marquées du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, nous ont été fournis par la bienveillance de MM. PICHAT et de ses collaborateurs. Un des premiers soucis du chimiste-organicien et du pharmacologue est de connaître la durée de stabilité du produit synthétisé ; et ceci suppose que le contrôle de la pureté radiochimique et radioactive ait donné des résultats satisfaisants. Nous ne parlerons que du contrôle des substances radioactives que nous avons utilisées dans nos travaux, le facteur de pureté étant l'essentiel dans l'interprétation de nos résultats pharmacologiques.

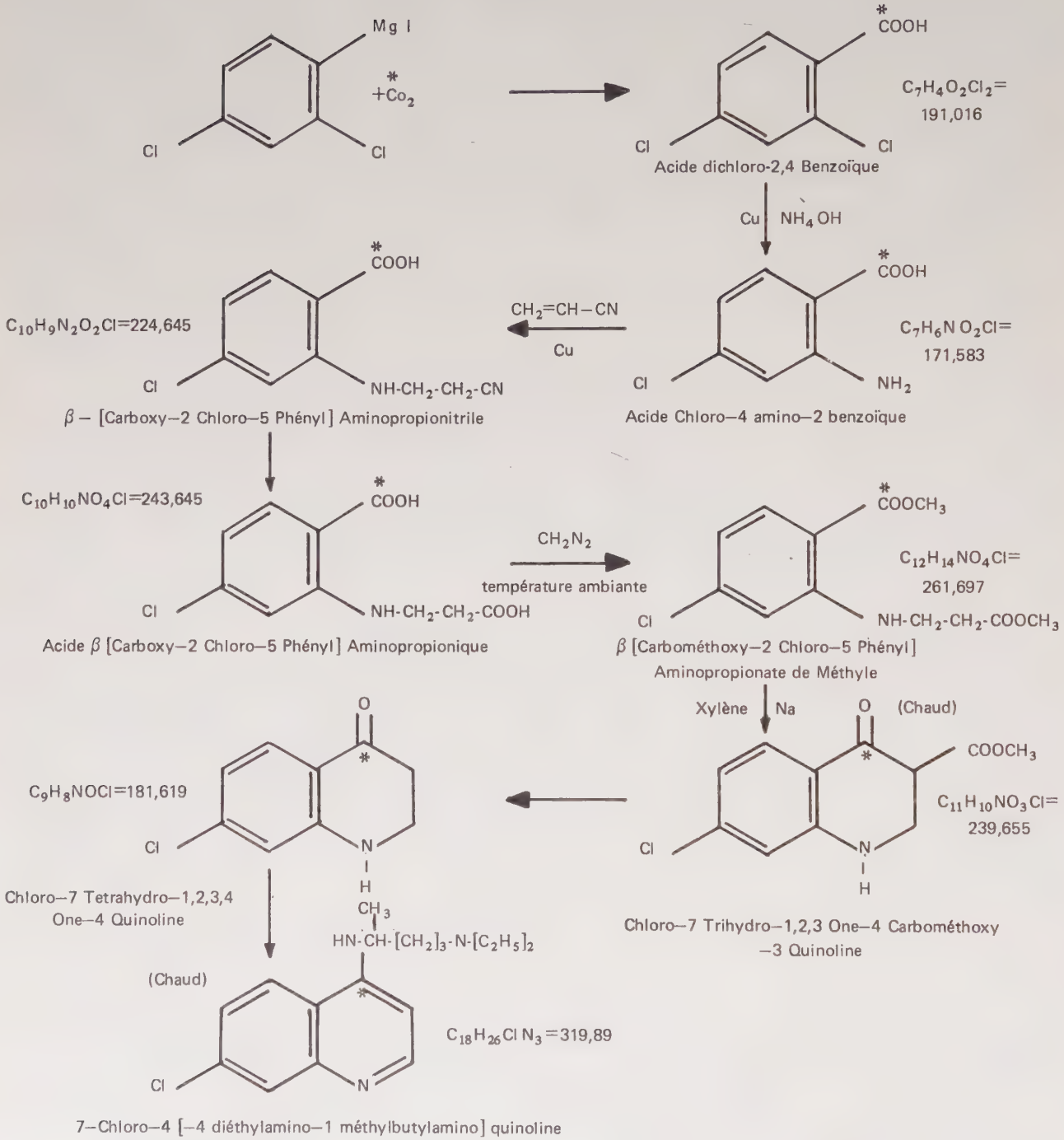
1 - Pureté radiochimique de la chloroquine marquée au carbone 14

La solution du produit fini ne doit renfermer aucune trace des produits intermédiaires obtenus au cours de la synthèse de la chloroquine ^{14}C. Le contrôle de la pureté radiochimique se fait par la méthode radiochromatographique que nous avons décrite dans le Chapitre III. M. PICHAT et ses collaborateurs utilisent des solvants spéciaux dont deux d'entre eux nous ont donné des résultats particulièrement intéressants, le premier étant constitué de phénol et eau (80, 20) et le second de butanol, acide acétique et eau (50, 25,).

Avec le premier solvant, la chloroquine marquée ou non, ne migre pas, alors que les impuretés migrent.

Les radiochromatogrammes obtenus avec le deuxième solvant montre au contraire que la chloroquine migre avec un Rf = 0, 40 . Les impuretés qui forment des taches très faibles sur le radiochromatogramme sont probablement constituées par des traces de quinolone. La chaîne aminée ne migre pratiquement pas. Son Rf est compris entre 0 et 0, 15. Toutes ces impuretés sont éliminées par passage sur colonne de résine de la solution de la chloroquine ^{14}C, après extraction en milieu basique.

SCHEMA SOMMAIRE D'UNE DES METHODES DE SYNTHESE DE LA CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14



Le solvant utilisé dans ce cas est constitué d'éthanol amoniacal. Après plusieurs purifications sur colonne de Silicagel Woelm pour chromatographie de partage avec éthanol-ammoniaque conc. (90, 10), le produit fini est à nouveau soumis à un comptage au Geiger-Müller. La solution de la chloroquine ^{14}C que MM. PICHAT et ses collaborateurs nous ont fournie contenait 2 à 3 °/₀ d'impuretés marquées, 0 °/₀ d'impuretés non marquées, et présentait 100 °/₀ de pureté radionucléidique.

2 - Stabilité de la chloroquine ^{14}C

Nous n'avons utilisé que des produits préparés depuis moins de quatre mois. Tous les contrôles auxquels le produit a été soumis dans le Service des Molécules Marquées n'ont révélé aucune augmentation d'impuretés. En revanche, nous avons constaté que la chloroquine marquée ou non marquée, se dégrade progressivement avec le temps. En effet, une chloroquine ^{14}C synthétisée en 1963 par MM. PICHAT et ses collaborateurs, conservée en flacon scellé, était devenue jaune, et sa solution très toxique pour les animaux d'expérience, les souris et les rats. En effet, alors que l'injection de 0,4 ml de la solution de chloroquine ^{14}C limpide livrée en 1969, à nos animaux d'expérience, rats de poids moyen de 350 g à la dose de 15 µCi n'entraîne aucun effet toxique, la solution du produit synthétisé en 1963 injecté dans les mêmes conditions, est mortelle.

CHAPITRE V

DETERMINATION DE LA DL 50 DE LA CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14 CHEZ LA SOURIS NORMALE ET LA SOURIS IMPALUDEE

Avant de traiter nos animaux par la chloroquine ^{14}C, nous avons jugé indispensable de déterminer la toxicité de ce produit (DL 50) chez la Souris normale et la Souris impaludée.

La DL 50 a été déterminée par la voie intraveineuse et par la voie intrapéritonéale, ces deux voies d'administration ayant été utilisées durant nos travaux.

Nous avons utilisé la méthode de BLISS (1943) pour la seule raison qu'elle ne fait intervenir aucune donnée arbitraire pouvant interférer dans nos résultats de détermination de la quantité de chloroquine ^{14}C à injecter aux animaux pour avoir une détection possible de la radioactivité avec les compteurs dont nous devons nous servir.

I - TOXICITE AIGUE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C. DETERMINATION DE LA DL 50 CHEZ LA SOURIS IMPALUDEE PAR VOIE INTRAVEINEUSE PAR LA METHODE DE BLISS (1943)

Les tableaux V-1, V-2, V-3 et la figure V-1 rendent compte des résultats obtenus. Pour évaluer les erreurs que pourrait entraîner la prise en considération de la droite provisoire de regression que nous avons tracée à vue, nous nous proposons de calculer l'équation de cette droite en partant uniquement des données de notre expérience, c'est-à-dire :

a) Le nombre des animaux par dose.
b) Les logarithmes des doses.
c) Les probits efficaces.
d) Les coefficients de pondération.

- Tracé de la courbe théorique de regression

Le tableau suivant donne les valeurs de y calculées en fonction des logarithmes des doses établies au cours de mes expériences.

TOXICITE AIGUE DE LA CHLOROQUINE

DETERMINATION DE LA DL 50 CHEZ LA SOURIS IMPALUDEE PAR VOIE INTRAVEINEUSE

METHODE DE BLISS

Doses exprimées en		Nombre d'animaux par dose	Mortalité	Pourcentage de mortalité	Probits empiriques	Probits attendus	% correspondant aux probits attendus	Coefficients de pondération	"Poids"	Probits efficaces	Produit de:	Produit de:	Produit de:
V	Log_{10}	n	m	P	Pr. E.	Pr. A.	P (Pr.a)	w	n × w	y	n×w×x	n×w×y	n×w×x×y
125	2,09691	20	1	5	3,36	3,36	5	0,2110	4,22	3,32	8,85	14,01	29,38
250	2,39794	20	4	20	4,16	4,05	17	0,4445	8,90	4,22	21,30	37,50	90,00
500	2,69897	20	7	35	4,61	4,69	38	0,6146	12,30	4,70	33,20	57,75	155,90
1000	3,00000	20	13	65	5,39	5,41	66	0,6020	12,04	5,40	36,12	65,01	195,05
2000	3,30103	20	18	90	6,28	6,08	86	0,4448	8,90	6,32	29,36	56,22	185,60

Tableau V-1

x^2	$\Sigma n \times w \times x^2$	$\Sigma n w$	$\Sigma n w x$	$\Sigma n w y$	$\bar{x}$	$\bar{y}$
$(2,1)^2 = 4,41$	$4,22 \times 4,41 = 18,61$	4,22	8,85	14,01	$\frac{\Sigma nwx}{\Sigma nw} =$	$\frac{\Sigma nwy}{\Sigma nw} =$
$(2,4)^2 = 5,76$	$8,90 \times 5,76 = 51,26$	8,90	21,30	37,50	$= 128,83$	$= 230,49$
$(2,7)^2 = 7,29$	$12,30 \times 7,29 = 89,67$	12,30	33,20	57,75	46,36	46,36
$(3)^2 = 9$	$12,04 \times 9 = 108,36$	12,04	36,12	65,01	⇓	⇓
$(3,3)^2 = 10,89$	$8,90 \times 10,89 = 96,92$	8,90	29,36	56,22		
	364,82	46,36	128,83	230,49	2,77	4,97

$\Sigma n w x y$	$(\Sigma n w x)^2$	$(\Sigma n w x)(\Sigma n w y)$
$8,85 \times 3,32 = 29,38$		
$21,30 \times 4,22 = 89,89$		
$33,20 \times 4,70 = 156,04$	$(128,83)^2$	$128,83 \times 230,49$
$36,12 \times 5,40 = 195,05$	⇓	⇓
$29,36 \times 6,32 = 185,56$		
655,92	16597,1689 16597,17	29694,03

Tableau V-2

$$Sxx = \Sigma nwx^2 - \left(\frac{\Sigma nwx}{\Sigma nw}\right)^2 = 364,82 - \frac{16597,17}{46,36} = 364,82 - 358,00 = \boxed{6,82}$$

$$Sxy = \Sigma nwxy - \frac{(\Sigma nwx)\,(\Sigma nwy)}{\Sigma nw} = 655,92 - \frac{29694,03}{46,36} = 655,92 - 640,50 = \boxed{15,42}$$

$$a = \frac{Sxy}{Sxx} = \frac{15,42}{6,82} = \boxed{2,26}$$

EQUATION DE LA DROITE THEORIQUE DE REGRESSION :

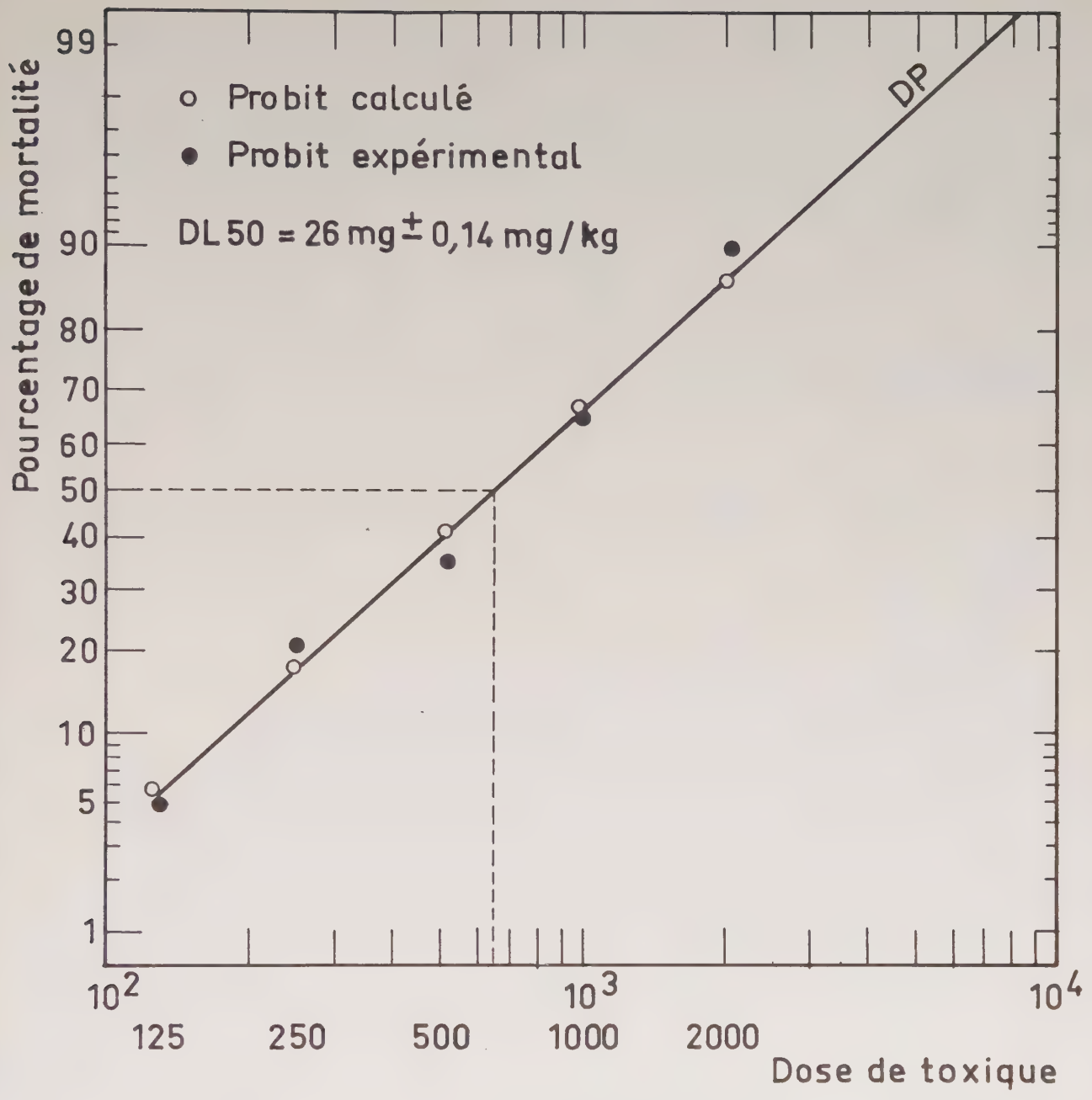
$$Y = \bar{y} + a\,(x - \bar{x}) = 4,97 + 2,26\,(x - 2,771 = 2,26\,x + 4,97 - 6,26 = 2,26\,x - 1,29 \text{ soit}$$

$$\boxed{Y = 2,25\,x - 1,30}$$

CONSTRUCTION DE LA DROITE THEORIQUE DE REGRESSION : Donnons à X, les valeurs des doses exprimées en logues de base 10 dans la 2e colonne du tableau I et calculons les valeurs correspondantes de Y qui représentent les probits efficaces calculés :

x = 2,09691	2,10	Y = 3,43	6	
x = 2,39794	2,40	Y = 4,10	19	
x = 2,69897	2,70	Y = 4,78	41	Pourcentage de mortalité calculé
x = 3		Y = 5,45	67	
x = 3,30		Y = 6,13	87	

Tableau V-3



TOXICITE AIGUE - I.V. DE LA CHLOROQUINE ^{14}C
DROITE DE REGRESSION - SOURIS IMPALUDEES

Figure V - 1

X = 2,09691	y = 3,43
X = 2,39794	y = 4,10
X = 2,69897	y = 4,78
X = 3,30	y = 6,13

Ces valeurs de y représentent les probits correspondants aux pourcentages de mortalité suivants : 6 °/₀ , 19 °/₀ , 41 °/₀ , 67 °/₀ , 87 °/₀ . Cette droite donne par simple lecture sur le graphique, la valeur de la dose correspondant à la mortalité 50 °/₀ soit 0,650 mg pour une souris de 25 g ou

$$\frac{0,650 \text{ mg} \times 1\,000}{25} = 25 \text{ mg/kg d'animal.}$$

Les tableaux V-2, V-3, nous montrent les calculs de chacun des facteurs notés ci-dessus. Comme le montre le tableau V-3, l'équation de la droite est donnée par la formule

$$Y = 2,25\ x - 1,30$$

En plaçant sur la figure V-1 les points correspondants aux pourcentages de mortalité calculés et notés dans le tableau V-3, nous constatons qu'ils sont pratiquement sur la même droite que les points expérimentaux.

- Calcul de l'écart-type approché

Dose correspondant à 20 °/₀ de mortalité (Probits = 4,05) = 250 µg .

Dose correspondant à 90 °/₀ de mortalité des animaux (Probits : 6,08) = 2 000 µg.

Nombre d'animaux compris entre ces deux doses :

$$20 \times 4 = 80$$

$$\text{Ecart type} = \frac{2\,S}{\sqrt{2\,N'}} = \frac{1\,750}{160}$$

Ecart-type approché = 0,140 mg.

La DL 50 = 26 $\pm$ 0,14 mg / kg d'animal.

$\bar{x}$ = moyenne des doses exprimées en logarithme de base 10

$\bar{y}$ = moyenne des ordonnées correspondant à la moyenne x

y = probits efficaces

W = coefficient de pondération

$$\bar{x} = \frac{n \,.\, W \,.\, x}{n \,.\, W} \quad ; \quad y = \frac{n\ w\ y}{n\ w}$$

$$sxx = n.w\,(x - \bar{x})^2 = n.w.x^2 - \left(\frac{\Sigma\, nwx}{nw}\right)^2$$

$$sxy = n.w\,(x - \bar{x})\,(y - \bar{y}) = nwxy) - \frac{(\Sigma\, nwx)\,(\Sigma\, nwy)}{n\,w}$$

$$a = \text{pente de la droite de régression} = \frac{sxy}{sxx}$$

L'équation théorique de la droite de régression a été établie en utilisant la relation :

$$y = \bar{y} + \frac{sxy}{sxx}(x - \bar{x})$$

La relation : $\frac{2\,S}{\sqrt{2\,N'}}$ a été utilisée pour l'estimation de l'écart-type approché de la DL 50.

2 S = différence entre deux doses choisies de telle manière que cette différence représente l'augmentation de dose nécessaire pour que la réponse de l'animal sous l'action de la drogue s'accroisse de deux probits.

N' = nombre total d'animaux compris entre ces deux doses, y compris ceux de ces deux dernières.

Les divers paramètres qui nous ont permis de déterminer la DL 50 se définissent et se calculent comme suit :

n = nombre d'animaux utilisés par dose

x = doses exprimées en logarithmes de base I

II - DETERMINATION DE LA DL 50 DE LA CHLOROQUINE ^{14}C, CHEZ LA SOURIS NON IMPALUDEE PAR VOIE INTRAVEINEUSE

Par la même méthode, nous avons déterminé la DL 50 de la chloroquine ^{14}C chez la Souris non impaludée. Nous avons procédé de la même façon que dans le paragraphe I.

Les tableaux V-4, V-5 et la figure V-2 rendent compte des résultats obtenus. La DL 50 obtenue affectée de son écart-type est donné par :

$$(DL50) = 28\ mg \pm 0,14\ mg/kg$$

Ce résultat, comparé à celui qui a été obtenu sur les animaux impaludés ne nous permet pas de conclure à une différence significative ; en effet, le calcul de (t) de STUDENT nous donne une valeur de 0,17 qui ne figure pas dans la table de (t). La différence entre les deux doses n'est pas significative dans le contexte de nos expériences.

TOXICITE AIGUE DE LA CHLOROQUINE

DETERMINATION DE LA DL 50 CHEZ LA SOURIS NON IMPALUDEE PAR VOIE INTRAVEINEUSE

METHODE DE BLISS

Doses exprimées en		Nombre d'animaux par dose	Mortalité	Pourcentage de mortalité	Probits empiriques	Probits attendus	Probits attendus en %	Coefficients de pondération	"Poids"	Probits efficaces	Produit de:	Produit de:	Produit de:
Y	Log_{10}	n	m	P	Pr. E.	Pr. A.		w	n × w	y	n×w×x	n×w×y	n×w×x×y
125	2,09691	20	1	5	3,36	3,45	6	0,241	20×0,241 = 4,82	3,40	10,1071	16,3880	34,3641
250	2,39794	20	5	25	4,33	4,08	18	0,448	20×0,448 = 8,96	4,46	21,4852	39,9616	95,8240
500	2,69897	20	6	30	4,48	4,69	38	0,614	20×0,614 = 12,28	4,56	33,1425	55,9968	151,1298
1000	3,00000	20	14	70	5,52	5,31	62	0,616	20×0,616 = 12,32	5,62	36,9600	69,2384	207,7152
2000	3,30103	20	17	85	6,04	5,99	84	0,476	20×0,476 = 9,52	6,20	31,4255	59,0240	194,8381

Tableau V-4

$\Sigma nw = 47,90$; $\Sigma nwx = 133,1203$; $\Sigma nwy = 240,6088$; $\Sigma nwxy = 683,8712$;

x^2	$n \times w \times x^2$
$(2,1)^2 = 4,41$	$4,82 \times 4,41 = 21,2562$
$(2,4)^2 = 5,76$	$8,96 \times 5,76 = 51,6096$
$(2,7)^2 = 7,29$	$12,28 \times 7,29 = 89,5212$
$(3)^2 = 9$	$12,32 \times 9 = 110,8800$
$(3,3)^2 = 10,89$	$9,52 \times 10,89 = 103,6728$

$\Sigma nwx^2 = 376,9398$

$(\Sigma nwx)^2 = 17721,0143$; $(\Sigma nwx)(\Sigma nwy) = 32029,9156$

$$Sxx = \Sigma nwx^2 - \frac{(\Sigma nwx)^2}{\Sigma nw} = 376,9398 - \frac{17721,043}{47,90}$$

$$= 376,9398 - 369,9585 = \boxed{6,9813}$$

$$\bar{x} = \frac{\Sigma nwx}{\Sigma nw} = 2,7791$$

$$Sxw = \Sigma nwxy - \frac{(\Sigma nwy)(\Sigma nwy)}{\Sigma nw}$$

$$= 683,8712 - \frac{32029,9156}{47,90} = \boxed{15,1883}$$

$$\bar{y} = \frac{\Sigma nwy}{\Sigma nw} = 5,0231$$

$$a = \frac{Sxy}{Sww} = \frac{15,1883}{6,9813} = \boxed{2,1755}$$

$Y = \bar{y} + a(X - \bar{x}) = 5,0231 + 2,1755 (X - 2,7791) = 5,0231 - 6,0459 + 2,1755 X.$

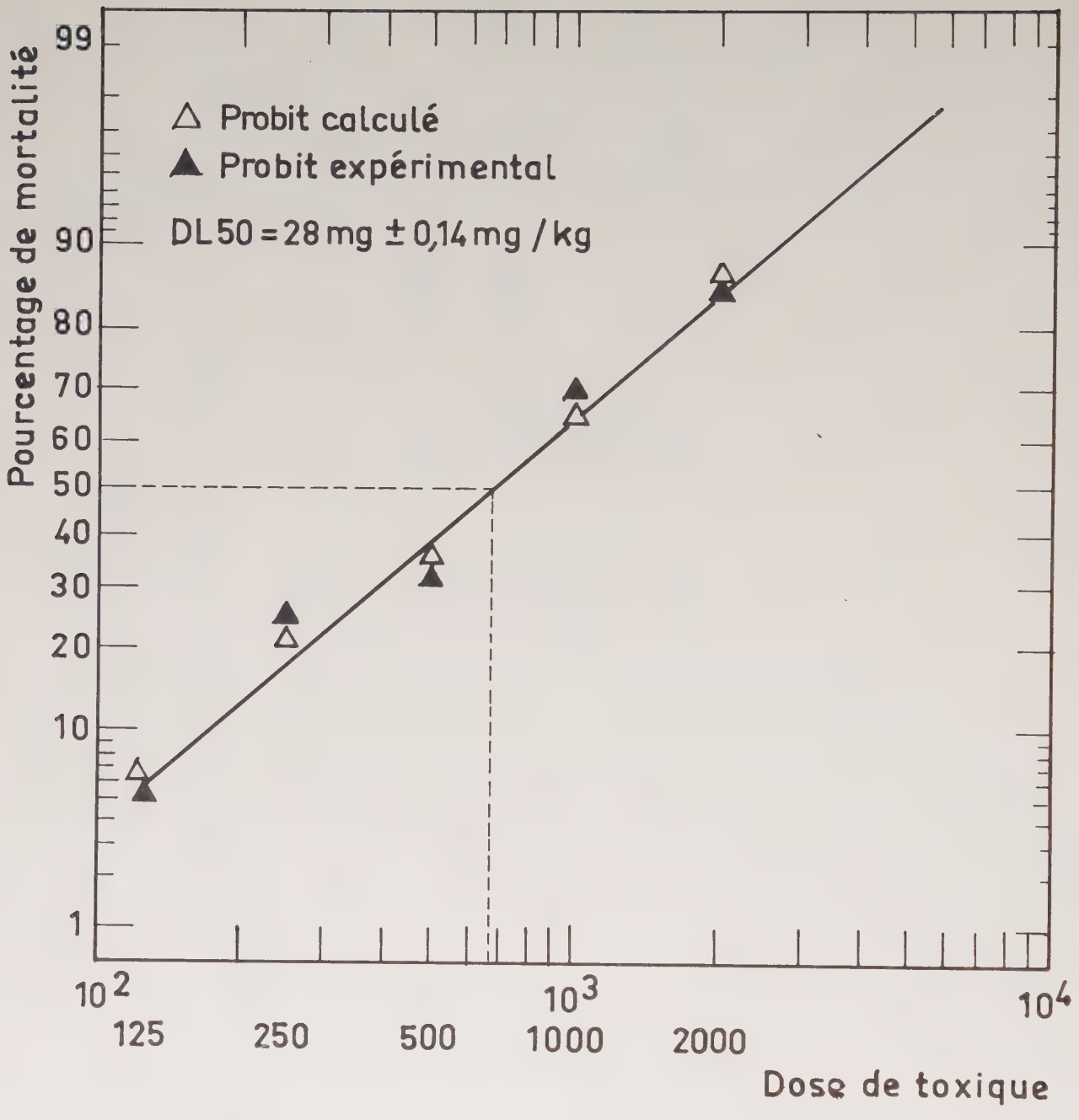
$$\boxed{Y = 2,1755 X - 1,0228}$$

CALCUL ET CONSTRUCTION DE LA DROITE DE REGRESSION CALCULEE :

Donnons à X, les valeurs 2,1; 2,4; 2,7; 3 et 3,4 qui sont les logarithmes des doses de la chloroquine injectée aux animaux non impaludés; nous obtenons les probits efficaces que nous transformons en pourcentage de mortalité P sur la courbe, soit :

X	2,1	2,4	2,7	3	3,3
Y	3,49	4,14	4,68	5,43	6,075
P	6 %	20 %	37 %	67 %	86 %

Tableau V-5



TOXICITE AIGUE - I.V. DE LA CHLOROQUINE ^{14}C

DROITE DE REGRESSION - SOURIS NON IMPALUDEES

Figure V - 2

CHAPITRE VI

DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LA SOURIS NORMALE ET LA SOURIS IMPALUDEE EN PERIODE D'ETAT

Les pharmacologues se sont toujours intéressés au sort des médicaments introduits dans l'organisme des êtres aussi bien unicellulaires que pluricellulaires ; les uns ont étudié leur pénétration et les autres leur fixation, le mécanisme de leur action.

Dans ce chapitre, nous rapportons les résultats de notre étude de la fixation en fonction du temps de la chloroquine marquée au carbone ^{14}C chez la Souris saine et la Souris impaludée.

Nous avons utilisé la méthode autoradiographique que nous avons décrite au Chapitre III. L'importance de cette méthode a été particulièrement notée par GROS (1965).

I - DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LA SOURIS SAINE AU COURS DU TEMPS

Pour l'étude de la distribution de la chloroquine ^{14}C chez la Souris saine, nous avons utilisé 26 souris réparties en 12 femelles, 12 mâles, 1 témoin mâle et 1 témoin femelle. Le produit à étudier, la chloroquine ^{14}C nous a été fourni par le Service des Molécules Marquées du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. Les caractéristiques de ce produit (lot 1065 CMM 232) sont sa radioactivité totale de 0,5 mCi et sa radioactivité spécifique de 11,5 mCi/mM. La figure VI-1, représente la formule développée de cet antipaludique de synthèse.

- Dose de chloroquine ^{14}C administrée à chaque animal

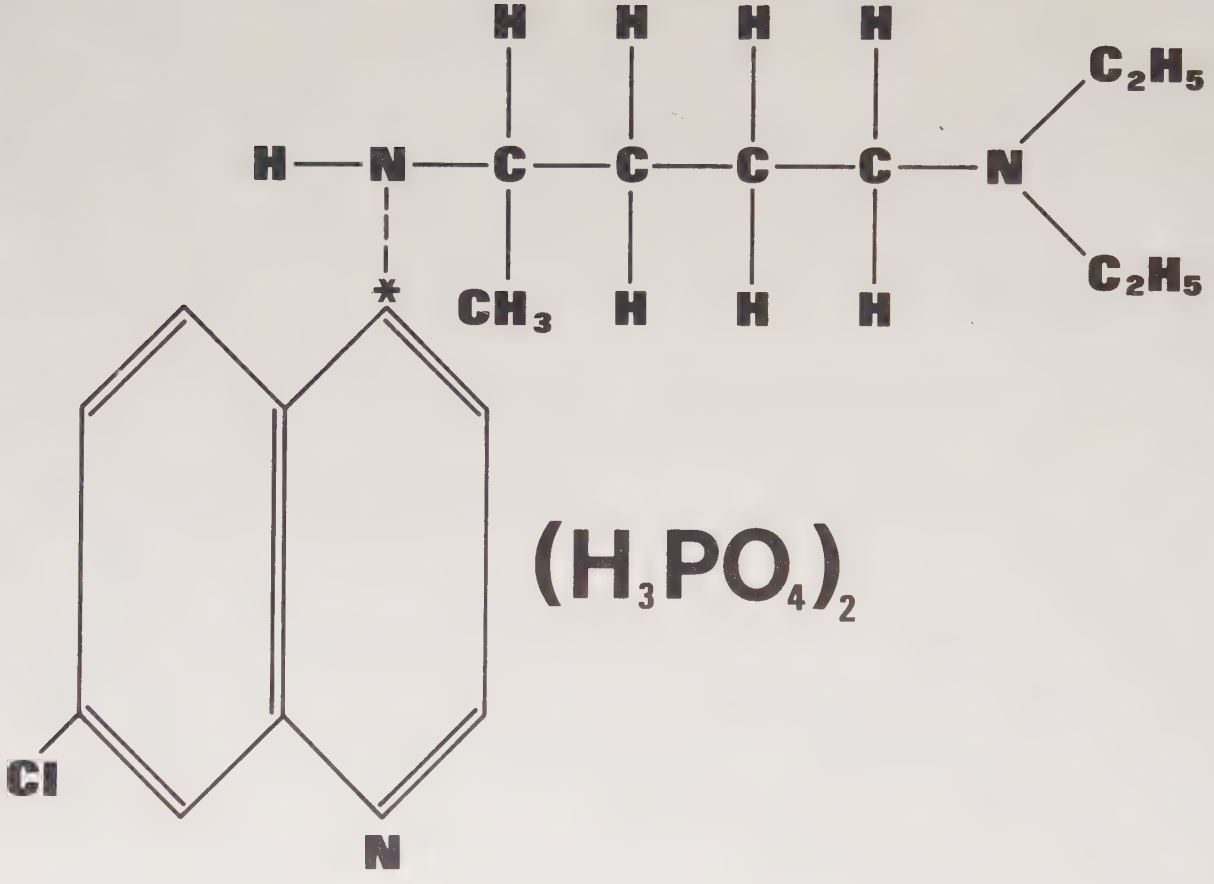
Chaque souris de 20 g reçoit 2 µCi : l'activité spécifique de la préparation étant de 11,5 mCi/mM nous calculons facilement la quantité de chloroquine injectée comme suit :

une mole : 515,9 grammes
une mMole : 0,5159 gramme

Donc nous avons 11 500 µCi/515,9 soit 22,30 µCi/mg de chloroquine ^{14}C ; chaque souris reçoit :

$$\frac{2}{22,30} \times 1 \text{ mg} = 0,089 \text{ mg ou } 89 \text{ µg de chloroquine } ^{14}C.$$

CHLOROQUINE MARQUEE AU CARBONE 14



* CARBONE RADIO-ACTIF

ACTIVITE SPECIFIQUE: 1,26 MILLICURIE (mCi)
PAR MILLIMOLE (mM)

Figure VI - 1

Nous sommes donc bien au-dessous de la DL 50 en I.V. qui est de 26 mg $\pm$ 0,14 mg/kg d'animal établie au Chapitre V.

Nous avons injecté 2,5 µCi par animal de 20 g sous un volume de 0,20 ml, la voie d'injection étant la veine de la queue. Au bout de 1 , 6 , 24 et 48 heures, les souris sont plongées dans l'azote liquide et conservées ensuite à - 20° pendant 48 heures. On procède alors à l'exécution des coupes comme il est indiqué plus haut (Chapitre III). Les résultats obtenus ont été les suivants :

A - Temps de survie de 1 heure

Comme le montrent les autoradiogrammes (figure VI-2) nous décelons de la radioactivité dans le foie, les reins, la rate, les glandes lacrymales, les poumons, le liquide céphalorachidien, les os de la colonne vertébrale, les glandes salivaires, la vessie, les poils, la glande thyroïde, la lumière intestinale.

B - Temps de survie de 6 heures

Nous notons la présence de radioactivité dans les mêmes organes, apparemment aux mêmes concentrations (figure VI-3).

C - Temps de survie de 24 et 48 heures

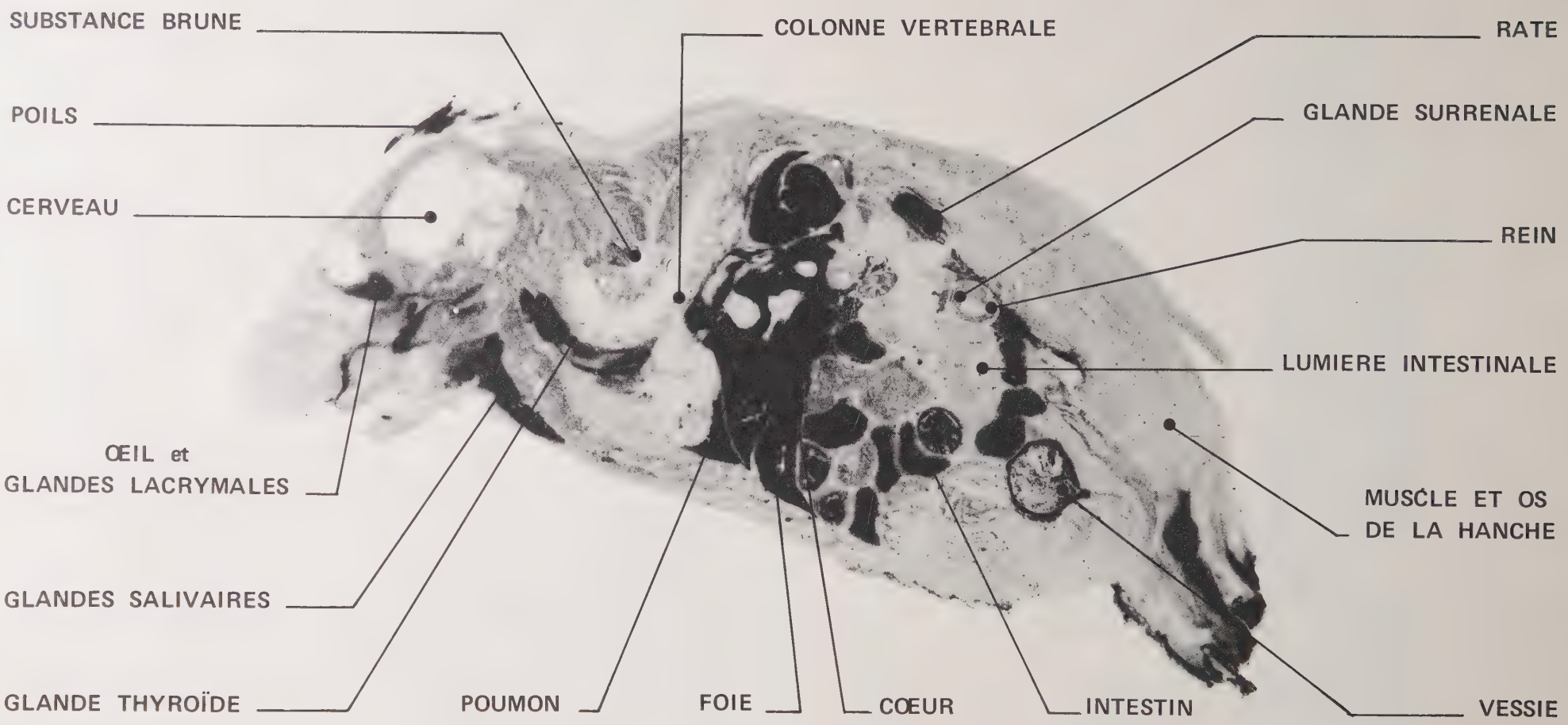
Nous n'avons pas observé une différence entre les autoradiographies de 24 et 48 heures chez les souris impaludées et les souris non impaludées (figures VI-5 et VI-6).

II - DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LA SOURIS IMPALUDEE PENDANT DES TEMPS VARIABLES

Après impaludation pendant 6 jours, selon la méthode de repiquage du Plasmodium berghei décrite dans le Chapitre I, les souris sont traitées comme précédemment ; elles reçoivent la même quantité de chloroquine ^{14}C et dans les mêmes conditions d'expérience.

Les autoradiogrammes obtenus avec des coupes de souris sacrifiées après 1, 6, 24 et 48 heures de traitement à la chloroquine ^{14}C révèlent la présence de chloroquine dans les mêmes organes décrits dans le paragraphe précédent chez les animaux sains (figure VI-4 et figure VI-6). Dans les tableaux VI-1, VI-2, VI-3, VI-4, nous avons résumé les résultats des autoradiographies les plus caractéristiques de cette étude qualitative de la localisation de la chloroquine chez les animaux sains et les animaux impaludés.

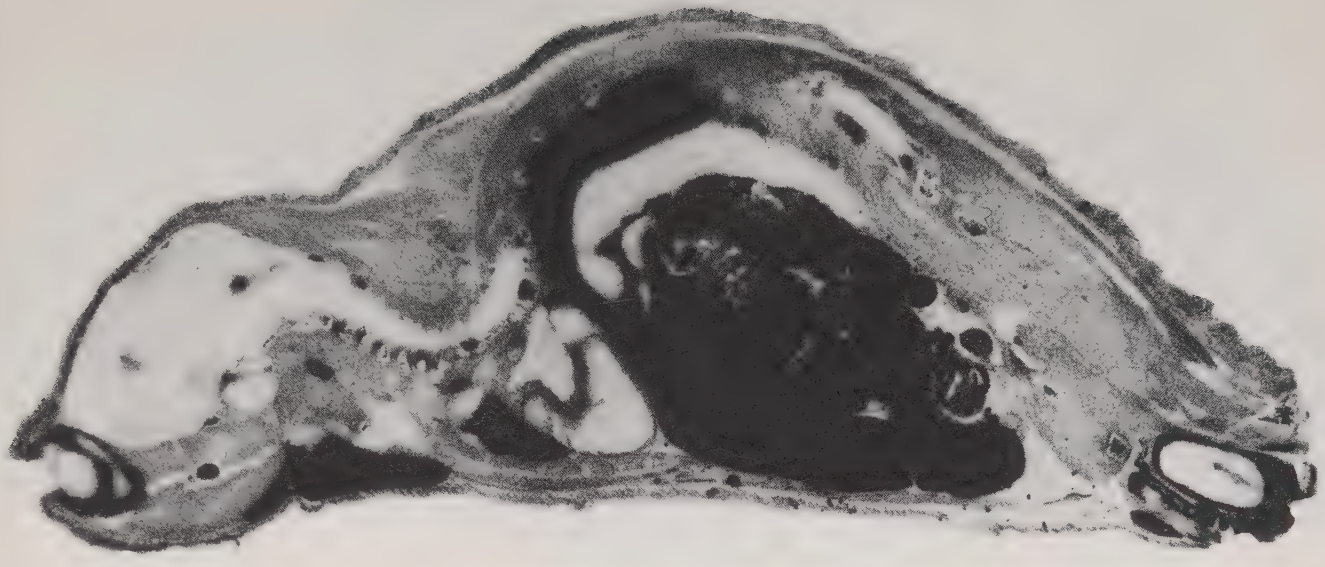
Ce chapitre nous permet de conclure que la chloroquine, en tant que substance chimique se fixe électivement sur le foie, la rate, les reins, les poumons, les glandes lacrymales, le liquide céphalo-rachidien, les os de la colonne vertébrale, les glandes salivaires, la thyroïde, les poids, la vessie, et la lumière intestinale. Nous ne distinguons pas très nettement une différence de concentration de noircissement sur les autoradiogrammes chez les animaux impaludés et les animaux non impaludés.



Souris saines traitées à la chloroquine ^{14}C pendant une heure.

Activité injectée : 2µCi/animal de 20 g.
Administration : par voie veineuse
Temps d'exposition des films : 8 jours

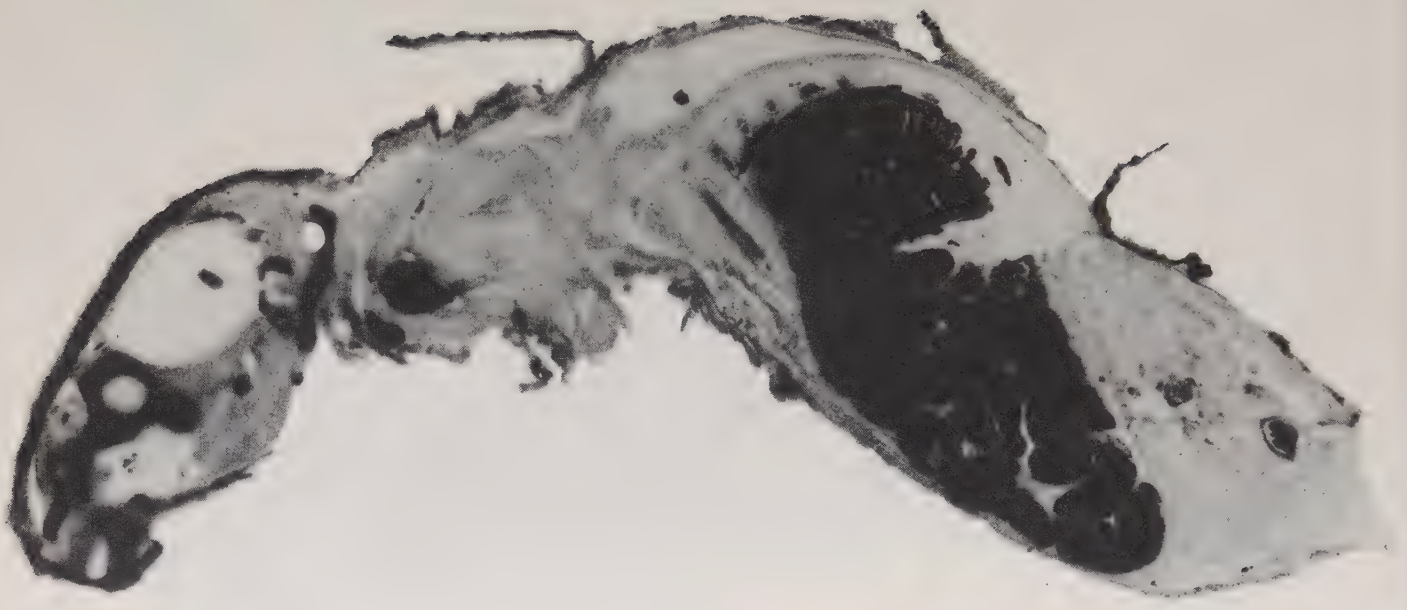
Figure VI - 2



Souris saines traitées à la chloroquine ^{14}C pendant 6 heures.

Activité injectée : 2 μCi/animal de 20 g.
Administration : intraveineuse
Temps d'exposition des films : 8 j.

Figure VI - 3

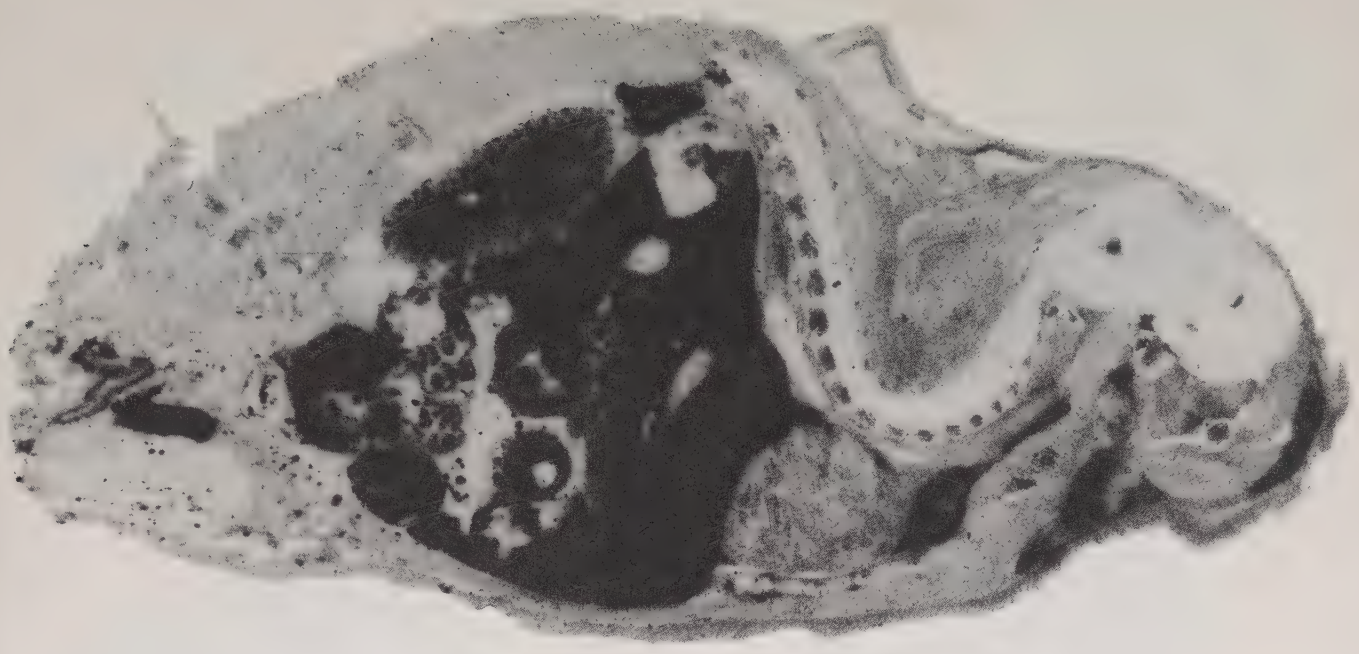


Souris impaludée, en période d'état,

traitée à la chloroquine ^{14}C pendant une heure.

Activité injectée : 2 µCi/animal de 20 g .
Voie d'administration : veine de la queue.
Temps de contact des films : 8 jours

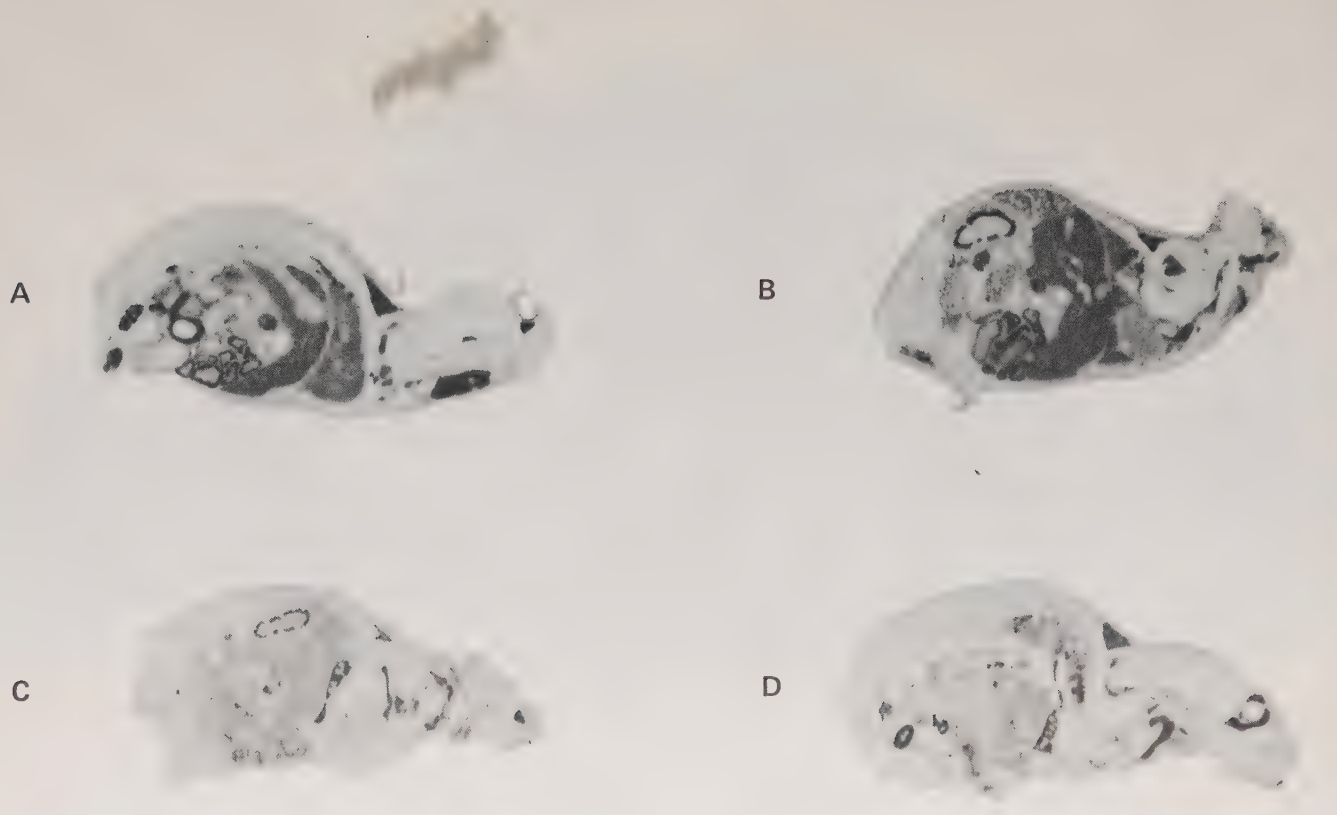
Figure VI - 4



Souris impaludées, en période d'état, traitées à la chloroquine pendant 6 heures.

Activité injectée : 2μCi/animal de 20 g.
Voie d'administration : veine de la queue.
Temps de contact des films : 8 jours

Figure VI - 5



A_{24} = souris saine

B_{48} = souris saine

C_{24} = souris impaludée

D_{48} = souris impaludée

Animaux impaludés et traités en période d'état (6 jours) à la chloroquine ^{14}C pendant 24 et 48 heures.

Activité injectée : 2 µCi/animal de 20 g.
Voie d'administration : veine de la queue.
Temps de contact des coupes : 8 jours

Figure VI - 6

TABLEAU VI-1

Distribution qualitative de la chloroquine marquée au Carbone 14,
1 heure après injection intraveineuse chez la souris saine

Absence de noircissement	Noircissement faible	Noircissement net	Noircissement important mais non différencié
Cerveau	Poumons	Foie	Lumière intestinale
Moelle épinière	Poils	Reins	
	Glandes salivaires	Rate	
	Glandes lacrymales		
	Os de la colonne vertébrale		
	Thyroïde		

TABLEAU VI-2

Distribution qualitative de la chloroquine marquée au Carbone 14,
6 heures après injection intraveineuse chez la souris saine

Absence de noircissement	Noircissement faible	Noircissement net	Noircissement important mais non différencié
Cerveau	Poils	Foie	Lumière intestinale
Moelle épinière	Glandes salivaires	Reins	
	Glandes lacrymales	Rate	
	Os de la colonne vertébrale		
	Thyroïde		

TABLEAU VI-3

Distribution qualitative de la chloroquine marquée au Carbone 14, 1 heure après injection intraveineuse caudale chez la souris impaludée pendant 6 jours

Absence de noircissement	Noircissement faible	Noircissement net	Noircissement important mais non différencié
Cerveau		Foie	Lumière intestinale
Moelle épinière	Poils	Reins	
	Colonne vertébrale	Rate	
	Glandes salivaires		
	Glandes lacrymales		
	Thyroïde		

TABLEAU VI-4

Distribution qualitative de la chloroquine marquée au Carbone 14, 6 heures après injection intraveineuse caudale chez la souris impaludée pendant 6 jours

Absence de noircissement	Noircissement faible	Noircissement net	Noircissement important mais non différencié
Cerveau	Poils	Foie	Lumière intestinale
Moelle épinière	Colonne vertébrale	Reins	
	Glandes salivaires	Rate	
	Glandes lacrymales		
	Thyroïde		

CHAPITRE VII

DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C DANS LE FOIE ET LA RATE DE RATS IMPALUDES AUX TEMPS DE 24 ET 48 HEURES

Le foie et la rate ont fait l'objet de nombreux travaux du point de vue de leur pouvoir de microphagocytose à l'égard de particules étrangères introduites dans l'organisme. C'est ainsi que RANVIER (1891), METCHNIKOFF (1892), KUPFFER (1899), MAXIMOW (1902), GOLDMAN (1909) et surtout ASCHOFF (1924) effectuant des injections intrapéritonéales au lapin, notent la présence de cellules étoilées revêtant l'endothélium et situées en contact avec le sang circulant. En 1949, DOBSON et collaborateurs constatent la localisation, dans les cellules de la moelle osseuse, du foie et la rate, de radiocolloïdes de l'yttrium, du zirconium, du columbium, et du lanthane.

En 1968, Y. COHEN avec J. INGRAND et R.A. CARO, en étudiant la distribution biologique du radiocolloïde d'or 198 en fonction du temps et du nombre de particules à la suite d'injections intraveineuses, montrent que ce colloïde radioactif se fixe électivement sur les organes riches en cellules réticuloendothéliales, et principalement le foie. La rate est le lieu où les hématies en voie de destruction se concentrent ; elle est donc d'un intérêt particulier pour nos travaux du fait que les hématozoaires du paludisme infestent les globules rouges ; de même, le foie, par sa fonction phagocytaire, nous a paru intéressant quant à la phagocytose de tous les éléments étrangers à l'organisme, aussi bien la chloroquine ^{14}C que le Plasmodium.

Les recherches exposées dans ce chapitre sont essentiellement consacrées à l'étude de la localisation à l'échelle cellulaire, et, plus particulièrement, sur le plan histologique, de la chloroquine ^{14}C soit dans le foie, soit dans les Plasmodiums contenus dans cet organe, et dans la rate d'animaux massivement impaludés. Le concours bienveillant de Monsieur MERLIN, Pharmacien-Ingénieur au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay nous a été précieux pour l'exécution de ces travaux. Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode d'autohistoradiographie décrite au Chapitre III.

20 rats mâles ont été massivement impaludés par voie intrapéritonéale avec du sang de souris dont le taux de parasitémie atteignait 75 °/₀ des hématies. 14 jours après l'impaludation, un contrôle de parasitémie sur un frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa, précédé d'une numération globulaire, a fait apparaître 65 hématies parasitées sur 100. Ce contrôle est confirmé par la palpation de la rate qui est devenue énorme par rapport à celle des rats

non impaludés. Nous injectons 8 µCi de chloroquine ^{14}C par voie intraveineuse dans la queue à chaque rat impaludé. De la même façon, 18 rats non impaludés reçoivent chacun 8 µCi de chloroquine ^{14}C. Deux rats de même poids et de même race non traités serviront de témoins.

24 heures après l'administration de la chloroquine ^{14}C, 10 rats impaludés, 9 rats non impaludés et un rat témoin sont sacrifiés. Les foies et les rates sont immédiatement prélevés et placés dans les liquides fixateurs.

Les 20 autres animaux, répartis comme précédemment sont tués après 48 heures, dans les mêmes conditions. Les foies et les rates sont prélevés de la même manière. Les différentes opérations de dissection, de fixation, de déshydratation, d'imprégnation, d'inclusion des échantillons d'organes prélevés ont été exposées en détail dans le Chapitre III, de même que l'obtention des coupes, leur coloration et la pratique des autohistoradiographies.

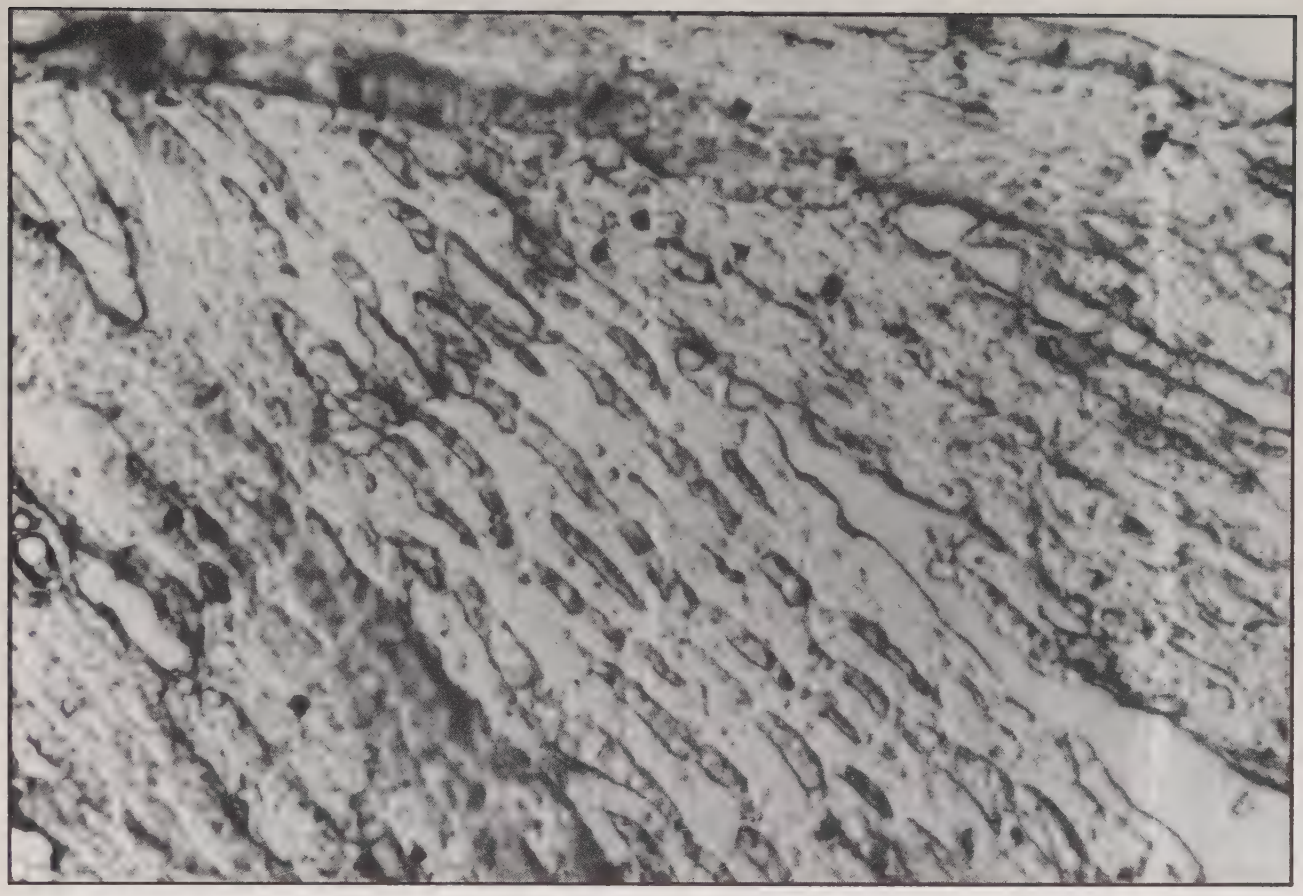
Pour la mise en contact de nos préparations de rates et de foies avec la gélatine nucléaire K 5 nous avons préparé 15 lames de coupes de foies impaludés colorées au bleu de toluidine, et 5 lames portant les mêmes préparations mais non colorées ; nous avons opéré de même avec les préparations de rates. Ces préparations sont laissées en contact avec l'émulsion nucléaire pendant un mois. Des préparations témoins ne contenant ni l'hématozoaire ni la chloroquine ^{14}C, ont été traitées de la même façon. Après ce délai d'un mois de contact, deux préparations de chaque série de lames non colorées ont été soumises aux colorations par le bleu de toluidine pour le foie et par la méthode de May-Grunwald-Giemsa pour la rate. Toutes les préparations ont été observées au microscope optique d'abord au faible et moyen grossissement sans lamelles, puis, à l'immersion (X 1 000).

- RESULTATS

Foies : Nous notons des dépôts de grains d'argent noirs sur la préparation comme le montrent les figures VII-1 et VII-2 ; nous trouvons les dépôts de grains d'argent dans le foie de rat non impaludé aussi bien au temps de 24 heures qu'à 48 heures (figure VII-3).

Rates : Chez les animaux non impaludés, on observe une réduction des grains d'argent de la gélatine nucléaire au niveau de la rate, mais le phénomène est moins intense que dans les organes des animaux impaludés (figures VII-4, VII-5, VII-6 et VII-7). Nous ne pouvons pas dire que cette localisation de la chloroquine ^{14}C au niveau du foie et de la rate soit due à la seule présence des hématozoaires du paludisme. En effet, au cours de nos travaux, nous avons noté la fixation élective de cette drogue dans la couche leucocytaire de culot de sang impaludé et non impaludé.

Le fait que les rates et les foies d'animaux impaludés fixent la chloroquine ^{14}C avec une intensité comparable à celle que l'on constate sur les mêmes organes d'animaux sains, tend à faire admettre que les tissus hépatiques et spléniques ont une certaine affinité pour cette drogue.

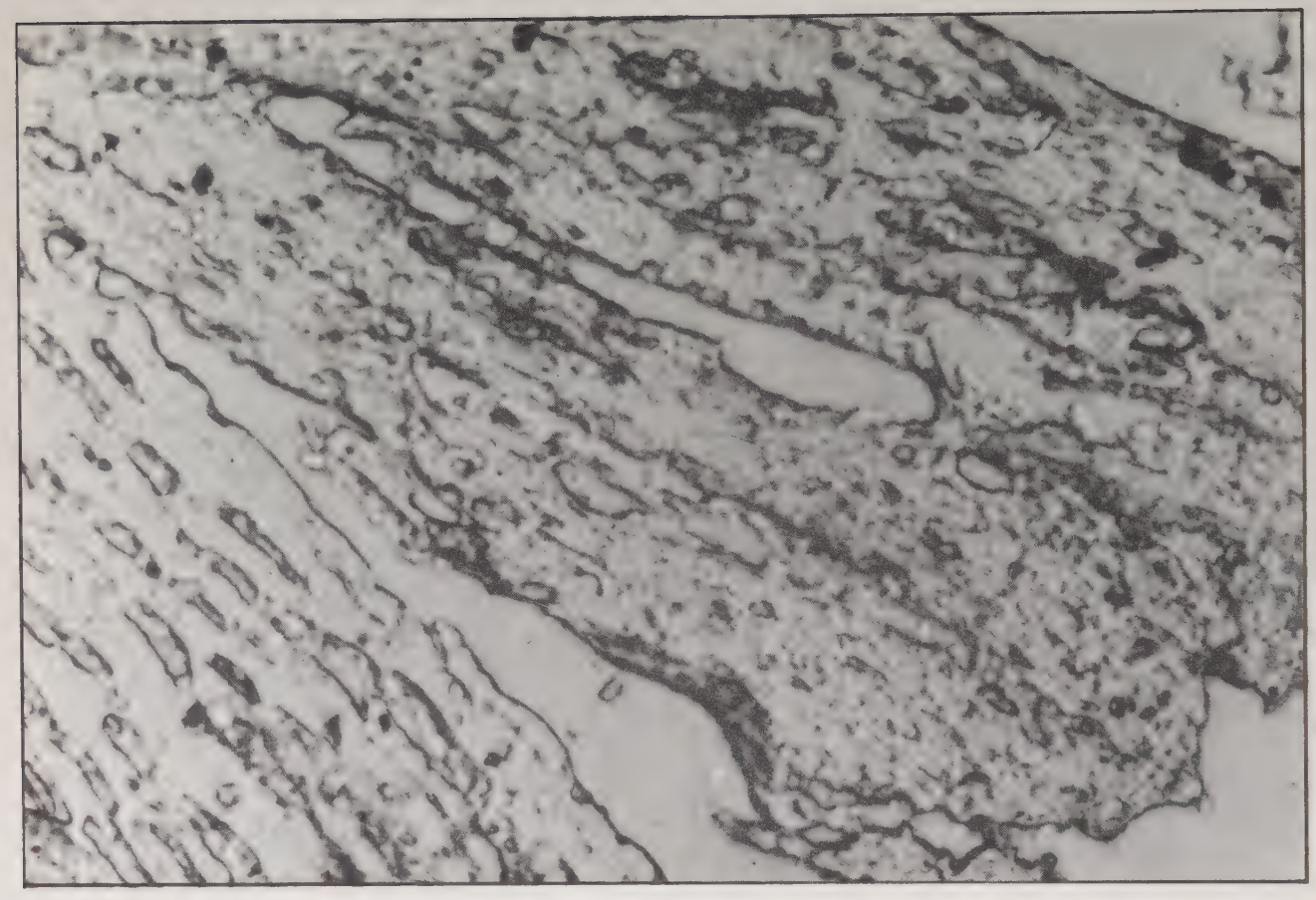


Coupe de foie de rat impaludé ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C (par voie IV) 14 jours après l'impaludation.

Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme de l'animal : 24 h. (x 100)

Les grains d'argent sont en noir sur la figure.

Figure VII - 1

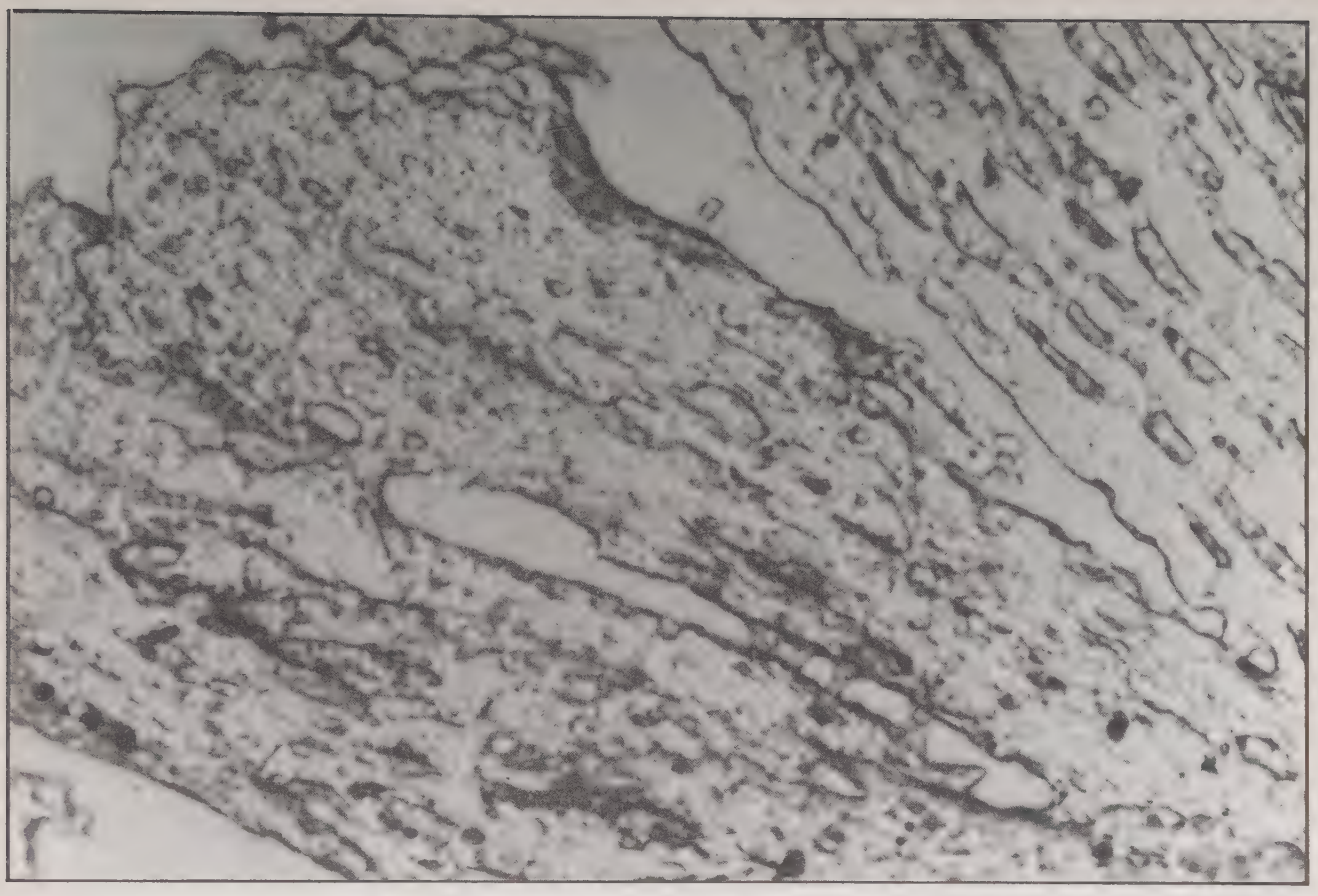


Coupe de foie de rat impaludé ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV, le 14e jour après l'impaludation.

Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C
dans l'organisme de l'animal : 48 h. (x 100)

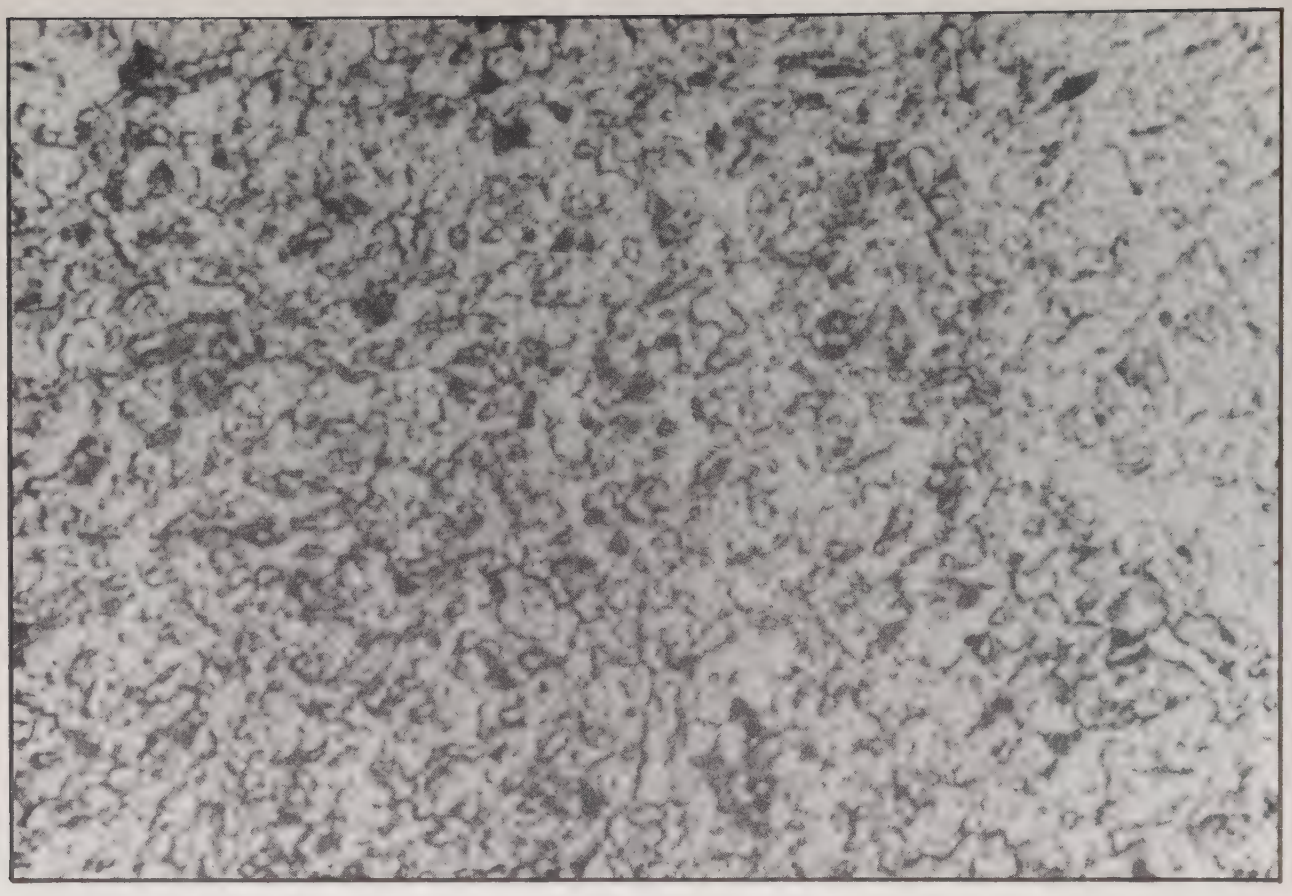
Les dépôts de grains d'argent sont en noir sur la figure.

Figure VII - 2



Coupe de foie de rat sain ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV.
Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C
dans l'organisme de l'animal : 24 h.
(x 100)

Figure VII - 3



Coupe de rate de rat impaludé ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV, le 14è jour après l'impaludation.

Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme de l'animal : 24 h.

(x 100)

Beaucoup de grains d'argent au niveau des sinus spléniques, en noir sur la figure.

Figure VII - 4

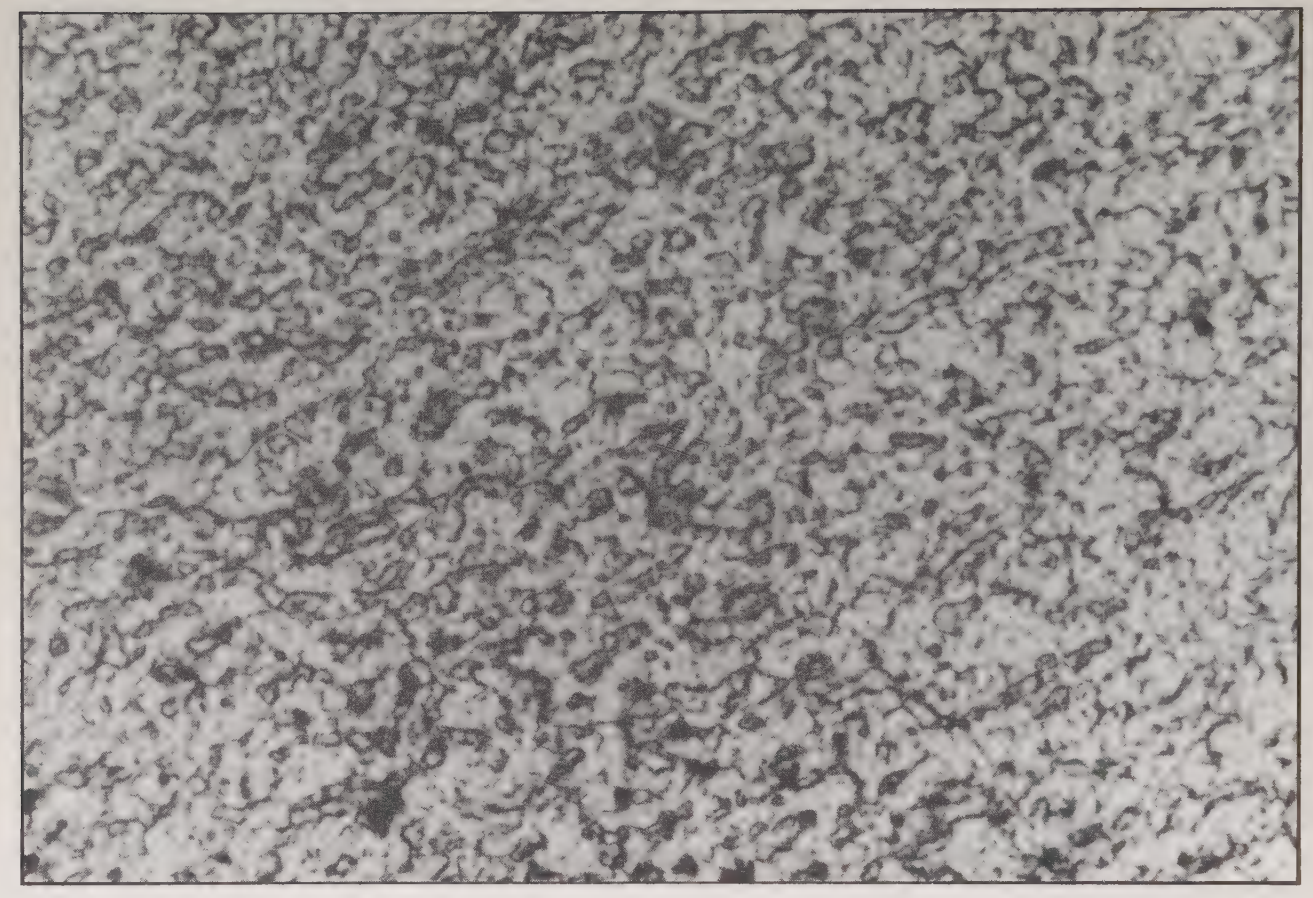
Coupe de rate de rat impaludé ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV, le 14è jour après l'impaludation.

Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C
dans l'organisme de l'animal : 24 h.

(x 1 000) (immersion)

Les dépôts de grains d'argent sont en noir au niveau des sinus spléniques.

Figure VII - 5



Coupe de rate de rat sain ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV.

Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C
dans l'organisme de l'animal : 24 h.

(x 100)

Les dépôts de grains d'argent sont en noir au niveau des sinus spléniques.

Figure VII - 6

Coupe de rate de rat sain ayant reçu 8 µCi de chloroquine ^{14}C, en IV.
Temps de séjour de la chloroquine ^{14}C
dans l'organisme de l'animal : 24 h.

(x 1 000)

Figure VII - 7

CHAPITRE VIII

ETUDE QUANTITATIVE DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LA SOURIS NORMALE ET LA SOURIS IMPALUDEE

L'étude qualitative de la fixation de la chloroquine ^{14}C nous a conduit à préciser la nature des "organes-cibles" de cette drogue comme nous l'avons noté dans le Chapitre VI. Le Chapitre VII nous a révélé que ces organes et particulièrement le foie et la rate, avaient une certaine affinité pour la chloroquine ^{14}C ; des travaux antérieurs ont montré que le taux de fixation de la chloroquine par les cellules provenant d'animaux impaludés ou non, variait en fonction du temps, et dépendait du taux de parasitémie et de l'espèce de Plasmodium. Dans ce chapitre, nous étudierons la cinétique de la fixation de la chloroquine ^{14}C en fonction de l'évolution de la parasitémie chez la Souris impaludée par le Plasmodium berghei sensible à cette drogue en opérant par comparaison avec des souris saines traitées dans les mêmes conditions.

Nous avons utilisé 50 souris dont 25 mâles et de poids moyen de 20 g. Nous avons impaludé 12 mâles et 12 femelles. 4 jours après l'inoculation du Plasmodium berghei, les souris impaludées sont traitées à la chloroquine ^{14}C à la dose de 8 µCi sous un volume de 0,20 ml par animal de 20 g, les animaux non impaludés sont traités par la même drogue et dans les mêmes conditions ; une femelle et un mâle non impaludés et non traités, servent de témoins. 1, 6, 48 heures après le traitement nous prélevons avec soin, le foie, les reins, la rate, les poumons, le coeur, le muscle de la cuisse, le cerveau, les yeux, le sang sur les animaux immédiatement sacrifiés par ponction cardiaque ou par section des carotides. Un prélèvement de 100 mg de chaque échantillon est alors introduit dans un flacon taré en présence de 1 ml de soluène 100. Dans chaque flacon contenant 100 µl de sang, on ajoute successivement 200 µl d'acide perchlorique à 65 °/₀ et 50 µl d'eau oxygénée. Après agitation, on laisse les organes se dissoudre pendant 24 heures à froid. Un chauffage à 60° pendant une heure préconisé par certains auteurs aurait pour effet de colorer les solutions d'organes et d'augmenter beaucoup le quenching. Le soluène est une solution basique de pH 8 d'hydroxyde d'ammonium quaternaire.

Pour le sang, nous avons utilisé le cellosolve qui est l'éthylène-glycol-monoéthylester ; c'est un liquide limpide d'odeur particulière.

Pour la mesure de la radioactivité contenue dans chaque échantillon, nous avons utilisé le compteur à scintillation en milieu liquide décrit au Chapitre III.

Nous avons utilisé un mélange scintillant constitué de 4 g de 2 - 5 diphénylloxazole (PPO), de 100 mg de diméthyl POPOP dissous dans 1 000 ml de toluène titré à 99 °/₀. Ce mélange scintillant n'est pas utilisable comme tel pour la mesure de la radioactivité contenue dans le sang. Pour ce tissu, nous avons utilisé un autre mélange scintillant comprenant 5 ml de cellosolve et 15 ml de toluène titré à 99 °/₀.

A - COMPTAGE DES ORGANES AU SCINTILLATEUR LIQUIDE

Pour déterminer la quantité de chloroquine ^{14}C exprimée en radioactivité en coups par minute, nous disposons avec le scintillateur liquide de deux possibilités, soit effectuer les mesures en se référant à un étalon - interne, soit opérer les comptages en utilisant les courbes de rendement du scintillateur Tricarb.

Dans le premier cas, nous avons utilisé un étalon interne de 0, 01 micro-curie pour chaque solution.

La solution de chaque organe obtenue comme il est indiqué plus haut, est amenée à 15 ml avec le mélange scintillant, auquel nous ajoutons 0, 1 ml contenant 0, 01 µCi. La même quantité de radioactivité est ajoutée à 15 ml de mélange scintillant ne contenant pas d'organe ; elle constitue le témoin. Nous avons répété les mêmes expériences cinq fois avec les mêmes données et dans les mêmes conditions expérimentales et nous avons calculé les moyennes des comptages faites sur 5 cycles de passage au compteur.

En nous référant à la définition du Curie qui est égal à $3,7 \times 10^{10}$ dés/s correspondant au nombre approximatif de désintégrations par seconde produites dans un gramme de radium, nous avons calculé l'activité correspondant à 0, 01 µCi.

1 micro-curie : $3,7 . 10^{4}$ des/s

0, 01 micro-curie : $3,7 . 10^{2}$ des/s.

Soit 0, 01 micro-curie = 22 200 dés/minute.

Connaissant le nombre de coups par minute de l'étalon relevés sur le compteur et le nombre de coups de cet étalon ajouté à chaque solution d'organe, nous établissons le rendement de chacun d'eux.

- Utilisation de la courbe de rendement préalablement établir pour le scintillateur Tricarb pour le carbone 14 :

Le principe utilisé est essentiellement fondé sur les A.E.S. ou activités de l'étalon externe établies comme suit :

L'activité du radium 226 ou du mélange radium + américium pris comme étalon en raison de l'avantage qu'ils offrent d'avoir une auto-extinction pratiquement négligeable, est mesurée dans les canaux du compteur à scintillation liquide. On établir ensuite le rapport entre cette activité relevée dans les canaux, les uns par rapport aux autres. L'auto-extinction étant nulle la presque totalité des photons émis par la source radioactive est transmise intégralement au dispositif électronique associée au détecteur.

Dans tous les canaux, on a :

$$\frac{\text{Activité comptée dans le canal 1}}{\text{Activité comptée dans le canal 2}} = 1$$

On dit alors que l'appareil donne un rendement de 100 °/₀.

Si maintenant, nous introduisons un échantillon quelconque dans cet appareil, nous devons relever une activité qui, divisée par l'activité standard nous donne un rapport égal à 1 si l'échantillon n'a pas d'auto-extinction ou un rapport inférieur à 1, s'il en présente une.

Pour n'importe quel échantillon, l'appareil nous donne immédiatement ce rapport correspondant au rendement pour chaque élément de tissu mesuré. La courbe des A.E.S. ci-après, figure VIII-1, a été établie en portant en abscisses les A.E.S. variant de 0 à 1, et en ordonnées, le rendement variant de 0 à 100 °/₀ .

Connaissant l'A.E.S. d'un échantillon on peut en inférer facilement par le calcul, la quantité de radioactivité contenue réellement dans cet organe. Le développement mathématique de cette question ne saurait être fait sans risquer d'alourdir notre exposé.

Notons que l'établissement de la courbe des A.E.S. procède exactement de la même manière que celui de l'étalon-interne.

Mais les A.E.S. ont l'avantage d'être fournies directement par l'appareil ; aussi y avons-nous eu recours dans toutes nos mesures de radioactivité.

Nous avons préféré passer à 48 heures de survie, car, nos travaux antérieurs nous ont montré qu'il n'y avait pratiquement pas de différence de concentration de radioactivité au niveau des "organes-cibles" détectés au début de nos travaux, au temps de 24 heures et de 48 heures.

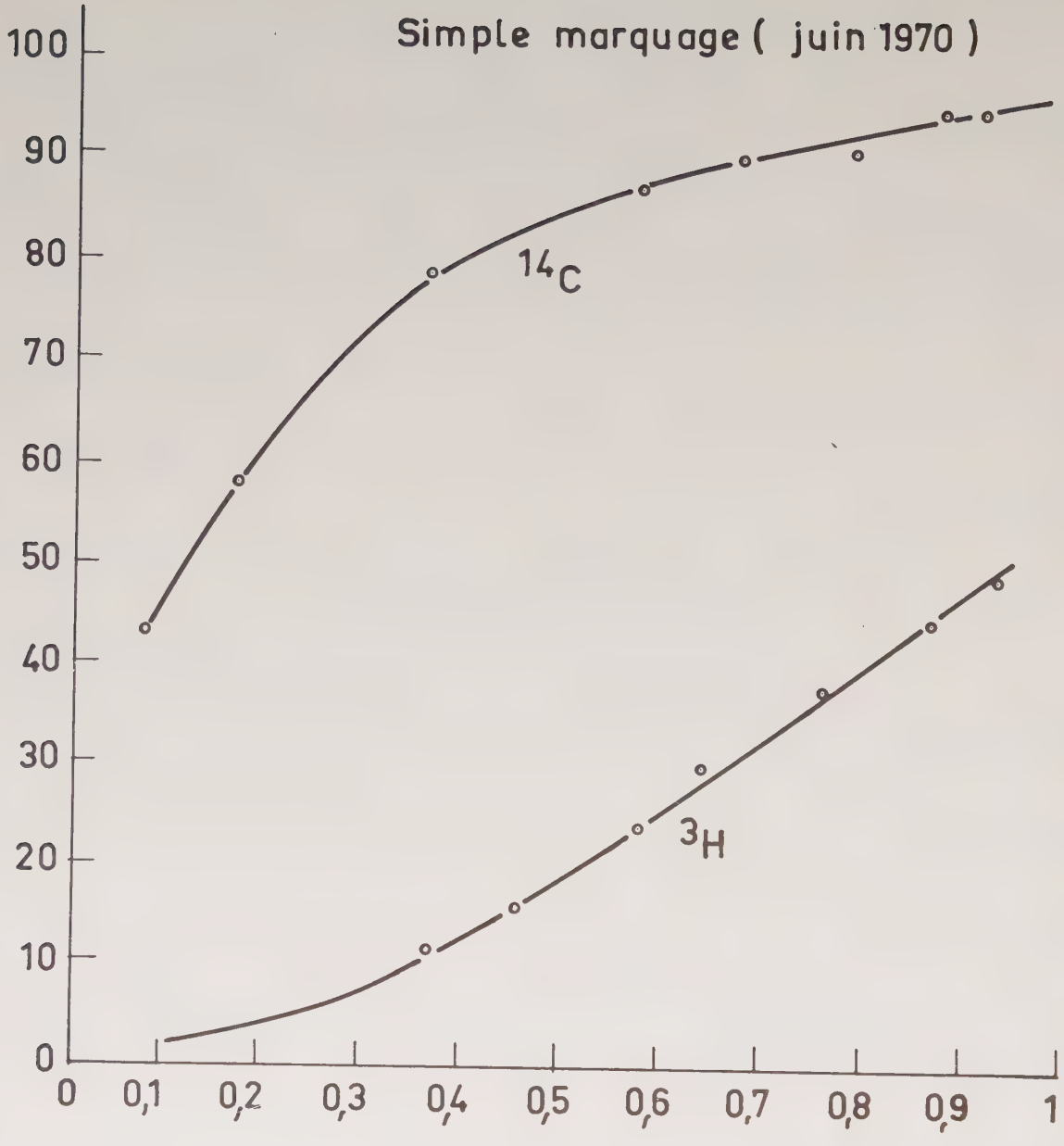
B - RESULTATS - OBSERVATIONS

- Animaux non impaludés

A l'analyse des trois tableaux résumant le processus de la fixation de la chloroquine ^{14}C au niveau des organes prélevés suivant les indications données au début de ce chapitre, nous notons la présence d'activité dans tous les cas.

1 - Temps de survie d'une heure

Nous avons noté une forte concentration de radioactivité au niveau du foie, des reins, des surrénales, de la rate et des poumons. Les pourcentages de radioactivité révélés dans 100 mg de ces organes par rapport à l'activité totale injectée exprimée en coups par minute sont de 0,43 °/₀ dans le foie ; 0,50 °/₀ dans les reins ; 0,23 °/₀ dans la rate. Dans les autres organes, ces pourcentages varient de 0,2 °/₀ pour le poumon à 0,008 °/₀ pour le cerveau ; cet organe semble fixer le moins intensément la chloroquine ^{14}C dans les conditions de nos observations (tableau VIII.1).



COURBE DE RENDEMENT DU SCINTILLATEUR TRICARLO

Figure VIII - 1

TABLEAU VIII.1

Animaux sains traités à la chloroquine marquée au carbone 14 pendant une heure

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en cous par minute contenue dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4					
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	1	2	3	4
Foie	0,3107	47110,1	0,3193	47565,5	0,4630	97709,2	0,3187	47807,5	63598,64	6421,75	116273,95	64540,13
Reins	0,4276	85626,2	0,4336	86272,2	0,5179	49087,3	0,4330	86270,4	105320,23	106114,81	56941,27	106112,59
Rate	0,2496	23313,1	0,2593	23890,7	0,3119	50142,3	0,2598	24042,7	34736,52	35597,14	62677,88	35823,62
Poumons	0,2990	49532,0	0,3074	50752,3	0,3138	134609,6	0,3089	50898,0	68354,16	71053,22	181722,96	6870,15
Coeur	0,4216	40571,7	0,4309	41041,4	0,4198	165459,3	0,4334	41142,0	49903,19	50480,92	20244,94	50604,66
Muscle	0,6475	7270,00	0,6481	7228,6	0,6503	13311,1	0,6482	7252,4	8142,40	8096,03	14775,32	8122,69
Cerveau	0,6299	1091,5	0,6315	1087,3	0,6561	2341,3	0,6340	1081,3	1233,40	1228,65	2598,84	1211,06
Sang	0,3558	4219,4	0,3556	4351,7	0,3533	2747,8	0,3560	4408,6	5443,03	5613,69	3544,66	5687,09
Yeux	0,6409	2940,6	0,6422	2873,0	0,5900	26012,3	0,6396	2869,6	3292,80	3217	29393,90	3213,95

2 - Temps de survie de 6 heures

La radioactivité est détectée au niveau des mêmes organes que précédemment. Mais, après 6 heures d'observation, nous n'avons pas noté un accroissement de la radioactivité dans les échantillons prélevés. Les pourcentages de chloroquine ^{14}C dosée semblent plutôt décroître allant de 0,19 °/₀ à 0,06 °/₀ pour le foie, les reins et la rate ; nous notons 0,27 °/₀ d'activité dans les poumons ; la fixation de la chloroquine ^{14}C sur les autres organes est très faible et très variable, allant de 0,27 à 0,06 °/₀ par rapport à l'activité totale administrée : 17 760.10^3 pcm (tableau VIII. 2).

3 - Temps de survie de 48 heures

Nous avons constaté également la radioactivité de chaque échantillon. La concentration de radioactivité ne croît pratiquement plus au-delà de ce temps de 48 heures (tableau VIII. 3).

- Animaux impaludés

1 - Temps de survie d'une heure

Tous les échantillons prélevés et comptés contiennent de la radioactivité en concentrations variables, le foie, les reins et la rate étant les organes les plus actifs. Les pourcentages calculés en fonction de la radioactivité totale injectée à chaque animal sont : 0,89 °/₀ pour le foie, 0,33 °/₀ pour les reins et 0,60 °/₀ pour la rate. L'intensité de la fixation de la chloroquine ^{14}C au niveau des autres organes semble peu importante. Dans tous les cas, nous notons dans les organes d'animaux impaludés une nette augmentation de fixation de la chloroquine par rapport au taux de fixation relevé chez les animaux sains. Précisons que la radioactivité notée est celle de 100 mg de l'échantillon considéré. De sorte que les pourcentages calculés en fonction de la totalité de la chloroquine ^{14}C injectée à chaque animal, ne nous donnent qu'une idée du pouvoir de captage de cette drogue par les organes choisis. Le foie, la rate, les reins, le sang des animaux impaludés, semblent fixer la chloroquine ^{14}C beaucoup plus que les mêmes organes d'animaux non impaludés (tableau VIII. 4).

2 - Temps de survie de 6 heures et 48 heures

Les organes prélevés sont tous radioactifs. Il n'y a pratiquement pas de différence entre les concentrations de chloroquine ^{14}C trouvés dans les divers organes des animaux impaludés aux temps 6 heures. Il n'en est pas de même toutefois dans le sang. La concentration de radioactivité étant plus élevée dans le sang impaludé aussi bien pour le temps de survie 6 heures que de 48 heures (tableaux VIII. 5 et VIII. 6). Pour nous assurer de la validité de nos observations, nous avons cherché à savoir si la différence de concentration de chloroquine ^{14}C relevée entre le

TABLEAU VIII. 2

Animaux sains traités à la chloroquine marquée au carbone 14 pendant 6 heures par voie intraveineuse

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en coups par minute contenue dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4					
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	1	2	3	4
Foie	0, 5974	22512	0, 6057	39311	0, 5770	38618	0, 5766	22619	25581, 9	44671, 5	44485, 4	25590
Reins	0, 5656	27317, 2	0, 5727	33190, 3	0, 5772	33250	0, 6999	29790, 2	31399	37931, 7	37970, 3	32490
Rate	0, 4839	8627, 4	0, 4674	10757, 5	0, 3355	9580, 1	0, 4333	11002, 8	10149, 8	12806, 5	12675, 9	12990, 7
Poumons	0, 3415	39072, 6	0, 3068	33571, 3	0, 3218	34681	0, 3355	38750	50416, 2	45988	46354, 1	50765, 2
Coeur	0, 5478	7002, 3	0, 5796	6680, 1	0, 7415	8004, 3	0, 6999	7457, 4	8095, 1	7591	8574, 3	8185, 8
Muscle	0, 6970	3739, 6	0, 6934	4505, 3	0, 5770	4275	0, 5840	3985, 1	4109, 4	4950, 8	4890, 1	4485, 2
Cerveau	0, 7053	9360, 6	0, 7296	7331, 1	0, 4333	8257	0, 6886	9082	10230, 1	7968, 5	9894	10180
Sang	0, 3143	2636, 8	0, 3118	2063, 7	0, 3355	2748	0, 2915	2594	3563, 2	2788, 7	3590, 3	3549, 7
Yeux	0, 6813	15726, 6	0, 6980	11101, 6	0, 6807	15830	0, 6807	14980	17474	12199, 6	17588	16490
Blanc	0, 8777	46, 5	0, 8777	46, 5	0, 8777	46, 5	0, 8777	46, 7	56	56	56	56

TABLEAU VIII. 3

Animaux sains traités à la chloroquine marquée au carbone 14 pendant 48 heures par voie intraveineuse

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en coups par minute contenue dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4		1	2	3	4
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups				
Foie	0, 5665	6116, 3	0, 5434	11097, 8	0, 5770	12090	0, 4333	9156, 8	6990	12756	13840	10917, 8
Reins	0, 5866	4911, 4	0, 6134	18117, 6	0, 5770	18202	0, 5770	18180	5549, 6	20588, 1	20788, 1	20780, 2
Rate	0, 4886	1495, 7	0, 1203	1638	0, 1203	1640	0, 1302	1628, 1	1759, 6	3342, 8	3346, 9	3310, 7
Poumons	0, 4888	5060, 9	0, 4623	7624	0, 4780	7730	0, 4780	7824, 2	5954	9076, 1	9175, 2	9276, 4
Coeur	0, 5331	1870, 2	0, 5599	6085, 4	0, 6885	6190	0, 5091	5892, 8	2174, 6	6954, 7	6960, 8	6840, 8
Muscle	0, 6906	710, 3	0, 7279	1851, 5	0, 6999	1860	0, 6807	1782, 4	780, 5	2012, 5	2024, 5	1980, 1
Cerveau	0, 7242	1486, 9	0, 6653	1336, 9	0, 6885	1350, 2	0, 6999	1401, 1	1616, 1	1502, 1	1508, 1	1548, 2
Sang	0, 3144	249, 5	0, 3144	355, 2	0, 3001	325, 1	0, 2915	328, 8	337, 1	452, 9	448, 2	450
Yeux	0, 7014	1708, 7	0, 6948	4243, 5	0, 6948	4260, 8	0, 6807	4340, 2	1867, 4	4663, 1	4675, 1	4781, 2
Blanc												

TABLEAU VIII. 4

Animaux impaludés pendant une semaine et traités à la chloroquine pendant une heure

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en coups par minute contenue dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4		1	2	3	4
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups				
Foie	0, 5378	36071, 5	0, 4603	940128, 0	0, 5538	167535, 3	0, 5960	106559, 3	40760, 80	285752, 32	189314	120412, 01
Reins	0, 6225	14907, 8	0, 6204	108446, 8	0, 5672	67510, 2	0, 5857	23077, 2	16694, 74	121460, 42	76286, 53	26308, 1
Rate	0, 4274	6143, 8	0, 3992	182296, 9	0, 4509	92649, 7	0, 4216	15301, 9	7556, 87	229694, 09	110253, 14	16679, 07
Poumons	0, 3989	19065, 4	0, 4609	264084, 5	0, 3479	106357, 8	0, 2580	19946, 6	24022, 40	324260, 56	139328, 72	29720, 43
Coeur	0, 5569	4868, 6	0, 5841	47867, 2	0, 4592	22536, 8	0, 5160	6264, 6	5501, 52	54568, 61	26818, 79	7266, 94
Muscle	0, 7206	1945, 1	0, 6821	26337, 7	0, 6708	15247, 7	0, 6836	3818, 3	2100, 71	28708, 09	16924, 95	4161, 95
Cerveau	0, 6974	436, 6	0, 7212	3842, 2	0, 6789	1319, 2	0, 6863	333, 9	475, 89	4149, 58	1464, 31	363, 95
Sang	0, 4187	2796, 5	0, 3185	25097, 77	0, 3215	391	0, 3471	3853, 1	3160, 05	338881, 90	528, 26	5047, 56
Yeux	0, 6330	2329, 8	0, 6732	24948, 3	0, 6376	17883, 2	0, 6864	2303, 7	2609, 38	27692, 61	20029, 18	2511, 03

TABLEAU VIII. 5

Animaux impaludés pendant six jours et traités à la chloroquine marquée au carbone 14 par voie intraveineuse pendant 6 heures

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en coups par minute contenue dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4		1	2	3	4
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups				
Foie	0, 5766	10128, 3	0, 5031	26009, 5	0, 5026	26000, 2	0, 5766	27002	22873	30599, 3	30599	30618, 2
Reins	0, 5848	9185, 3	0, 6140	12279, 3	0, 7415	13574, 1	0, 5770	12647	10378, 8	14294, 6	14487, 8	14470, 1
Rate	0, 3355	8730, 3	0, 3815	12868, 4	0, 4780	1 2904	0, 3814	12790	11487, 2	16289, 2	16390, 2	35880
Poumons	0, 4039	20576, 1	0, 4134	29004, 5	0, 4333	2 9100	0, 4039	28940	25720, 1	35808	35901	4891
Coeur	0, 5772	4063, 6	0, 5091	4118, 8	0, 5766	4122	0, 5091	4230, 1	4644, 1	4789, 3	4790, 2	1725, 1
Muscle	0, 6999	1354, 5	0, 7338	1585, 1	0, 7272	1590, 2	0, 6999	1580, 1	1488, 1	1722, 9	1727, 8	2624, 5
Cerveau	0, 7004	1676, 7	0, 7358	2401, 1	0, 7272	2409	0, 8400	2508, 2	1832, 4	2609, 8	2610, 7	5090, 7
Sang	0, 3182	3346, 1	0, 2893	3676, 1	0, 2893	3690	0, 2000	2980, 1	4521, 7	5177, 6	5180, 8	5478, 4
Yeux	0, 6886	6453, 8	0, 8841	5182	0, 8000	5270	0, 6885	4890, 8	7210, 9	5602, 1	5590, 2	
Etalon												

TABLEAU VIII. 6

Animaux impaludés pendant six jours et traités à la chloroquine pendant 48 heures par voie intraveineuse

Organes prélevés	- Moyenne des coups par minute - Moyenne des A.E.S. pour chaque organe d'animal pris individuellement								Radioactivité exprimée en coups par minute contenus dans chaque organe, calculée en fonction des A.E.S.			
	1		2		3		4		1	2	3	4
	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups	A E S	coups				
Foie	0, 5405	4612, 6	0, 5333	6180, 2	0, 5091	6180	0, 4780	5981, 2	5301, 8	7186, 2	7186	7095, 2
Reins	0, 6240	2540, 3	0, 6146	3515, 2	0, 5766	3609	0, 6807	4001, 8	2854, 2	3994, 5	4081, 5	4483, 1
Rate	0, 3218	1680, 1	0, 4333	2709	0, 5026	2804	0, 4039	2680, 2	2240, 1	3263, 8	3270, 8	3380, 9
Poumons	0, 4989	5673, 6	0, 5026	7513, 8	0, 4780	7401	0, 5026	7482, 3	6674, 8	8839, 7	8780, 5	8792, 2
Coeur	0, 6099	917, 7	0, 6216	1020, 7	0, 5770	10150	0, 4400	1040, 1	1042, 8	1146, 8	1154, 7	1260, 1
Muscle	0, 6878	840, 5	0, 7272	420, 1	0, 7272	501, 2	0, 7272	490, 8	933, 8	456, 6	540, 2	530, 2
Cerveau	0, 6934	878, 2	0, 7040	1215, 9	0, 6807	1313, 8	0, 6146	1250	965	1328, 8	1457, 4	1409, 1
Sang	0, 2915	853, 6	0, 2976	808, 5	0, 2915	809, 10	0, 3182	810, 9	1169, 3	1107, 5	1107, 8	1118, 9
Yeux	0, 7005	8172	0, 6807	5115, 6	0, 634	5300	0, 6934	5400	8932, 2	5684	5785, 7	5890, 1
Blanc												

sang impaludé et le sang non impaludé était significative. Pour cela, nous avons calculé l'écart-type de la moyenne sur nos mesures, ainsi que le test " t " de STUDENT (1968) aux temps de survie de 6 heures et de 48 heures. Nous avons utilisé 50 souris comme nous l'avons déjà noté. Dans cette population de 50 animaux, nous avons pris 4 échantillons que nous avons considérés comme représentatofs le sang de chaque souris a été compté pendant 5 cycles au scintillateur liquide Tricarb. Nous avons pris la moyenne arithmétique de chaque série de mesures. Nous avons utilisé les relations

$$Sm = \sqrt{S^2}$$

S^2 étant la variance, et Sm l'écart-type sur la moyenne ;

$$" t " = (\bar{x}_a - x_b) \sqrt{\frac{N_a \times N_b}{K^2 (N_a + N_b)}}$$

Les calculs des moyennes, des écarts-types sur la moyenne, les définitions des formules utilisées font l'objet d'ouvrages spécialisés dont celui de LISON (1968). Nous avons trouvé un écart-type de 529,13 pour les animaux impaludés et traités à la chloroquine pendant 6 heures, et de 510,41 pour les non impaludés. Dans ce cas, les moyennes affectées de leur écart-type sont le Ci cq^{14}C = 5 089,6 cpm $\pm$ 529,13 cpm où Ci cq^{14}C représente la concentration de chloroquine ^{14}C dans le sang de souris impaludées ; de même, nous désignerons par Cn cq^{14}C, celle du sang de souris non impaludées ; Cn cq^{14}C = 3 372,90 cpm $\pm$ 510,41 cpm. La comparaison de ces deux mesures nous donne " t " = 1,648.

La table des tests (t) nous donne t = 5,96 au moins pour 6 degrés de liberté et pour une probabilité de 0,1 °/$_{\circ}$ soit P = 0,001 : t calculé étant inférieur à t = 5,96, la différence entre la concentration de la même drogue dans le sang non impaludé n'est pas significative avec cette probabilité. Mais, pour une probabilité de 20 °/$_{\circ}$ on a, pour 6 degrés de liberté, t = 1,440 ; et pour une probabilité de 10 °/$_{\circ}$, t = 1,943. Donc $1,440 < t_{A,B} < 1,943$, $1,440 < 1,648 < 1,943$, donc

$$0,2 < P_{A,B} < 0,1 .$$

La différence entre la concentration de la chloroquine ^{14}C dans le sang impaludé et la concentration de la même drogue dans le sang non impaludé, pendant 6 heures, est significative pour la probabilité P = 0,2 ; elle n'est pas significative pour P = 0,1.

- Calcul des écarts-types sur les moyennes dans les cas de souris impaludées et traitées à la chloroquine ^{14}C pendant 48 heures, en période d'état, et des souris non impaludées ayant reçu la même dose de chloroquine ^{14}C pendant 48 heures (tableaux VIII. 3 et VIII. 6)

Nous avons opéré de la même façon, avec les mêmes formules, les mêmes approximations que précédemment. Nous aboutissons, en désignant par n_A le nombre des animaux impaludés et n_B les animaux non impaludés :

C_A cq ^{14}C = 1 125,875 $\pm$ 38,535 cpm

C_A cq ^{14}C = 422,050 $\pm$ 74,20 cpm.

t = 11,77 pour 6 degrés de liberté.

Selon la table de " t " pour 6 degrés de liberté, t doit être au moins égal à 5,96 pour une probabilité 0,1 °/₀ soit P = 0,001 : comme (t) calculé est supérieur à 5,96 , la différence entre la concentration de chloroquine ^{14}C dans le sang impaludé et dans le non impaludé est significative.

- CONCLUSION

La sensibilité du compteur à scintillation liquide nous a permis de déceler les faibles concentrations de chloroquine ^{14}C au niveau des organes que nous avons prélevés. La chloroquine marquée au carbone 14 semble se fixer davantage dans le foie, les reins, la rate, le sang, les glandes lacrymales avec le temps.

Le Plasmodium berghei aurait donc une affinité pour la chloroquine ^{14}C.

Le Plasmodium berghei augmente le captage de la chloroquine dans l'organisme impaludé.

CHAPITRE IX

DISTRIBUTION COMPAREE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C DANS LE SANG DES ANIMAUX SAINS ET DANS LE SANG DES ANIMAUX IMPALUDES EN PERIODE D'ETAT

Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que la chloroquine ^{14}C se trouve à concentration plus élevée dans le sang d'animaux impaludés que dans le sang d'animaux sains de même origine aux temps de 6 heures et de 48 heures. Ces conclusions sont en accord avec les travaux de MACOMBER (1966) suivant lesquels les érythrocytes parasités par le Plasmodium berghei sont capables de concentrer la chloroquine ^{14}C ; et que cette capacité de concentration irait en croissant, des cellules normales, aux cellules parasitées par Plasmodium berghei résistant à la chloroquine ^{14}C, puis aux cellules parasitées par Plasmodium Berghei sensibles à cette drogue. D'autres auteurs ont admis que la chloroquine comme les dérivés de la 4 - aminoquinoléine en général se fixe électivement sur les cellules nuclées ; son action antimalarique serait due à sa pénétration dans le Plasmodium et à sa fixation sur les nucléoprotéines.

Dans ce chapitre, nous étudierons les processus de fixation de la chloroquine ^{14}C sur les différents éléments sanguins : hématies, leucocytes, plasma et sur l'hématozoaire Plasmodium berghei.

I - DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C DANS LE SANG DE RAT NORMAL ET DE RAT IMPALUDE

Deux méthodes d'étude s'offraient à nous, consistant soit à séparer les différents éléments du sang par sédimentation et à compter la radioactivité de chaque fraction, soit à procéder par autoradiographie après sédimentation par centrifugation.

Nous avons préféré la seconde méthode parce qu'elle est plus simple, et plus pratique ; nous avons rencontré en effet des difficultés dans la séparation des globules blancs situés entre le plasma et les hématies dans le culot de centrifugation.

La répartition de la chloroquine ^{14}C dans les trois compartiments du sang s'est avéré identique chez la Souris et chez le Rat, impaludés et non impaludés.

Pour des raisons pratiques et quantitatives, nous avons opéré sur le sang de rat dans le cas de la centrifugation et l'autoradiographie, tandis que pour les frottis et l'autohistoradiographie nous avons eu recours au sang de souris.

1- Mode opératoire

Nous avons utilisé 22 rats mâles blancs de poids moyen de 350 g dont 11 ont été impaludés, les 11 autres étant gardés sains. Précisons que tous les animaux que nous avons utilisés au cours de nos travaux sont de même souche, de même espèce, de même origine (Ardenay). Deux semaines après l'inoculation du Plasmodium berghei, 10 animaux impaludés et 10 animaux sains sont traités à la chloroquine ^{14}C à la dose de 16 µCi par animal sous un volume de 0,40 ml. Un rat impaludé et un rat non impaludé ne sont pas traités à la chloroquine ; ils nous serviront de témoins. L'administration de la drogue a été faite par la veine du pénis des animaux. Tous les animaux sont mis sous anesthésie avec 2,5 ml d'une solution à 20 °/₀ de carbamate d'éthyle par voie intrapéritonéale, maintenus pendant une heure à 37° au moyen d'une plaque thermostatée. Avant de prélever le sang, les animaux reçoivent 0,20 ml d'héparine. Le prélèvement de sang se fait par ponction de l'artère abdominale. Ce sang recueilli est réparti dans des tubes à hémolyse décrits dans le Chapitre III. Après centrifugation, comme nous l'avons noté dans la description de la méthode plus haut, nous procédons à la congélation du sang. Les opérations qui suivent cette congélation sont décrites dans le Chapitre III.

2 - Résultats

Alors qu'une forte concentration de radioactivité est notée, au niveau de la couche leucocytaire, le plasma se révèle très peu actif. Dans la couche d'hématies, nous n'avons pas relevé de radioactivité notable, ni chez les rats impaludés ni chez les animaux sains. La concentration de radioactivité au niveau des globules blancs est la même chez les rats impaludés et les rats non impaludés.

La figure IX-1 illiuste les résultats de l'expérience que nous venons de résumer.

3 - Observations et conclusion

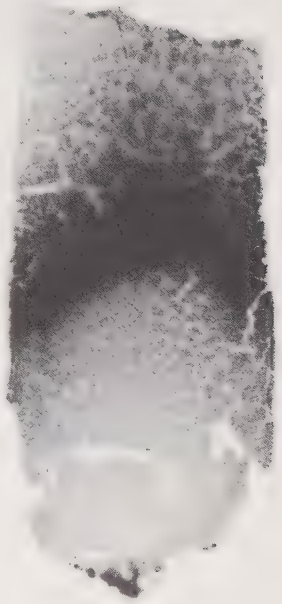
L'absence de chloroquine ^{14}C au niveau des hématies impaludées peut s'expliquer de différentes façons :

a) La chloroquine ^{14}C se fixerait sur le Plasmodium à l'intérieur des hématies où la radioactivité ne serait détectable qu'après leur lyse ;

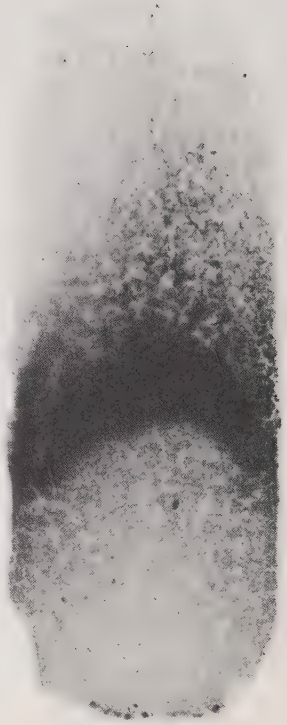
b) La chloroquine ^{14}C se fixerait sur le Plasmodium avec ouverture du noyau quinoléique et perte du carbone 14 radioactif ;

c) La chloroquine se fixerait effectivement sur le Plasmodium, mais de façon labile à la faveur de modifications sanguines pouvant survenir post mortem.

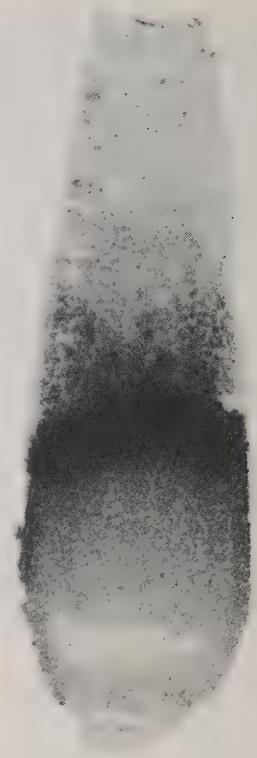
d) La présence d'une forte concentration de chloroquine au niveau de la fraction leucocytaire, semble prouver que ce produit est transporté électivement par les globules blancs. On peut alors se demander si les globules blancs sont un lieu de transit pour la chloroquine ^{14}C avant sa pénétration dans les hématies et sa fixation sur le Plasmodium. Dans cette éventualité



Autoradiogramme de coupe de culot de sang de rat sain et non impaludé, traité avec la chloroquine ^{14}C.



Autoradiogramme de coupe de culot de sang de rat impaludé traité avec la chloroquine ^{14}C.



Autoradiogramme de coupe de culot de sang de rat impaludé traité avec la chloroquine ^{14}C.

Figure IX - 1

la chloroquine se fixerait d'abord sur tous les éléments nucléés du sang jusqu'à une certaine concentration limite au-delà de laquelle, sa pénétration dans les hématies impaludées aurait lieu ? Cette dernière hypothèse semble aller dans le sens des observations de CONKLIN et CHOU (1970) qui notent l'existence d'une limite dans le pouvoir de concentration de la chloroquine ^{14}C par les cellules.

II - DISTRIBUTION DE LA CHLOROQUINE ^{14}C DANS LE SANG DE SOURIS SAINES ET DE SOURIS IMPALUDEES EN PERIODE D'ETAT

Pour l'étude de la distribution de la chloroquine ^{14}C dans le sang d'animaux sains ou impaludés en période d'état, nous avons utilisé la méthode d'autoradiographie décrite par KOSSINET et PEKTUKA (1960) et appliquée à l'hématologie. Le principe et le mode opératoire de cette méthode ont été déjà décrits dans le Chapitre III.

Deux lots de 10 souris mâles ont été constitués et dans chaque lot, les animaux sont répartis comme suit :

- Lot I : Ce lot est constitué par dix souris impaludées pendant 5 jours ; 8 d'entre elles reçoivent 8 µCi de chloroquine ^{14}C dans 0, 20 ml en injection intraveineuse, les deux autres souris impaludées servent de témoins.

- Lot II : Ce lot est constitué par des animaux sains ; 8 souris reçoivent la même quantité de chloroquine ^{14}C que ci-dessus par la même voie d'administration. Les deux souris saines servent de témoins. Une heure après l'injection de la chloroquine ^{14}C on procède aux frottis de sang prélevé sur chaque animal ; les frottis sont répartis en deux lots dans chaque série d'animaux :

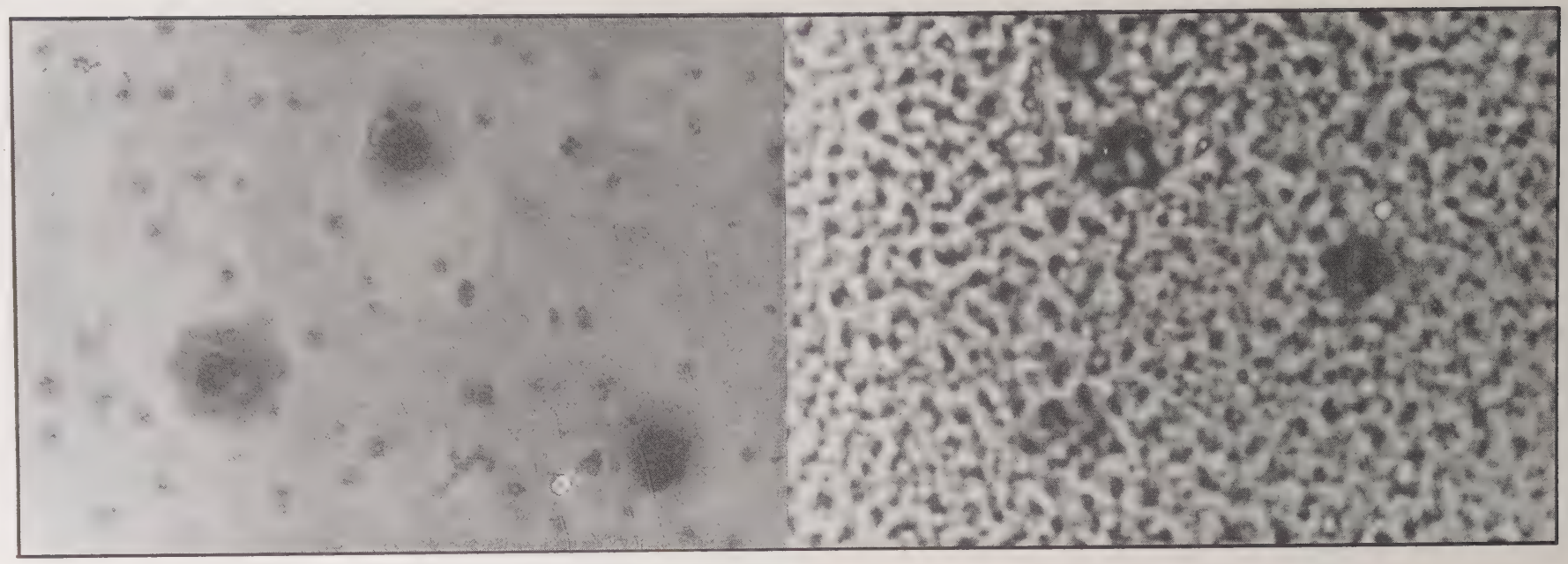
. 4 frottis correspondant aux animaux impaludés traités par la chloroquine ^{14}C sont colorés au May-Grunwald-Giemsa.

. 1 frottis de sang d'animal impaludé n'ayant pas reçu de chloroquine ^{14}C est coloré de la même façon. Nous opérons de même avec 4 frottis de sang d'animaux non impaludés traités à la chloroquine, et un frottis de sang de souris non impaludée et non traitée par l'antipaludique.

De la gélatine nucléaire Ilford n° K 5 est coulée sur tous les frottis, colorés et non colorés, et laissés en contact pendant un mois en prenant toutes les précautions notées dans le Chapitre III ; les préparations sont lavées, révélées, fixées et lavées à nouveaux (voir Chapitre III).

- Observations et résultats

Nous avons observé les lames après séchage au microscope optique au grossissement 1 000. Nous notons bien le noircissement du film gélatineux nucléaire, comme l'indique la figure IX-2 ; mais, le mouvement propre du support et du gel nucléaire est tel qu'il nous est dif-



Auto-historadiographie de sang de souris impaludées en période d'état (6 jours) traitées à la chloroquine pendant 1 heure.

Grossissement x 100

Difficulté de définition de la radio-activité due à la chloroquine ^{14}C au niveau des cellules et le mouvement propre de l'émulsion nucléaire.

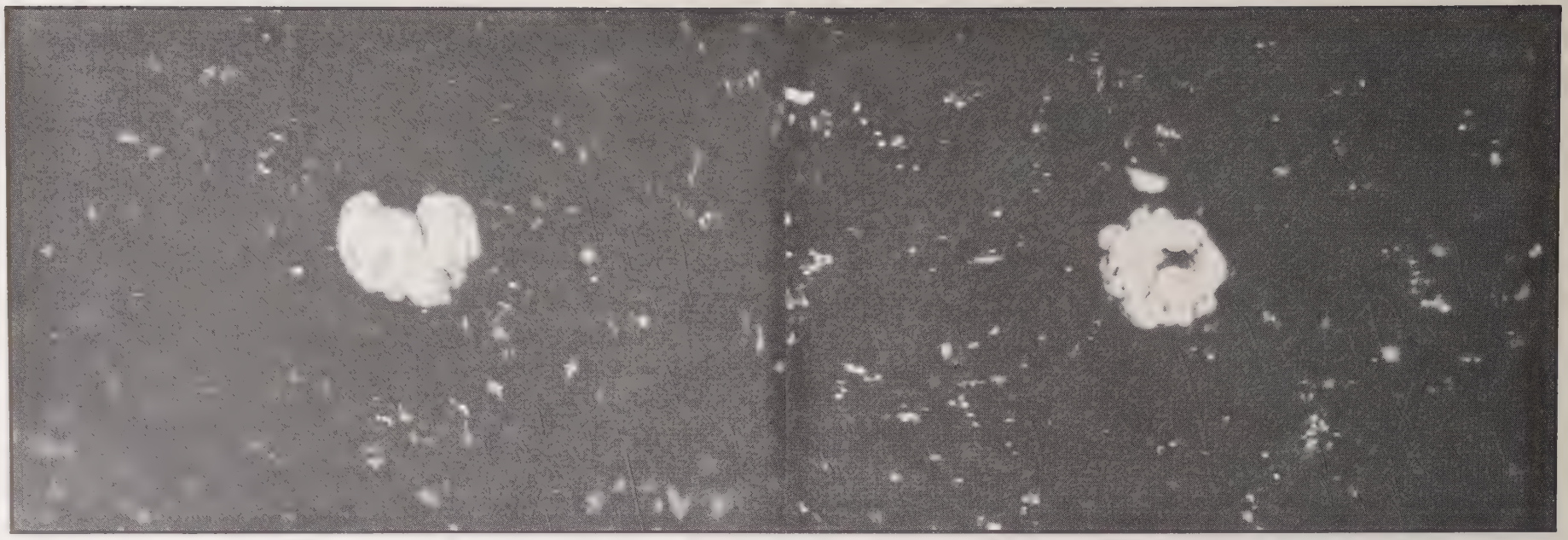
Figure IX - 2

ficile de dire s'il y a des différences de radioactivité d'un endroit à l'autre de la préparation. Malgré une observation sous éclairage aux halogènes, il ne nous a pas été possible d'émettre de conclusion nette sur la fixation de la chloroquine par les différents éléments sanguins pris individuellement (figure IX-3).

- CONCLUSION

La chloroquine ^{14}C se fixe électrivement sur les globules blancs dans le sang provenant aussi bien d'animaux impaludés que d'animaux sains. Pour mettre en évidence la fixation de la chloroquine ^{14}C sur le Plasmodium berghei, le seul moyen serait d'isoler et de concentrer toutes les hématies infestées par l'hématozoaire, de procéder à leur lyse, de façon à libérer le contenu de celle cellule, puis d'étudier les propriétés du produit résultant de la fixation de la chloroquine ^{14}C par les acides nucléiques des Plasmodiums.

La fixation élective de la chloroquine ^{14}C sur les leucocytes, nous incite à chercher de quelle manière cette drogue se métabolise dans l'organisme animal en présence ou non de Plasmodium berghei.



Auto-historadiographie de sang de souris impaludées en période d'état (6 jours) traitées à la chloroquine pendant une heure.

Activité injectée : 2 μCi/animal de 20 g.

Grossissement : x 100

Difficulté de définition de la radio-activité due à la chloroquine ^{14}C au niveau des cellules et au mouvement propre de la gélatine nucléaire.

Figure IX - 3

CHAPITRE X

METABOLISME ET EXCRETION URINAIRE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LE RAT SAIN ET CHEZ LE RAT IMPALUDE

De nombreux auteurs, comme DONALDSON (1924), CARMACK et coll. (1946), BRODIE et coll. (1946 et 1947), ALVING et coll. (1948), KURODA (1962), COHEN et LACAPERE (1963), CHESNEY et coll. (1965 et 1967), ont étudié le métabolisme de la chloroquine, les uns chez l'Homme, les autres chez les animaux sains ou arthritiques. La plupart de ces travaux ont montré que la chloroquine se transforme très lentement dans l'organisme en dérivés hydroxylés : quinones et quinonines ; 10 °/₀ seulement sont éliminés par les urines en 48 heures, 25 °/₀ en une semaine. Nos propres résultats nous ont permis de dire qu'elle se fixe aussi sur les tissus.

Dans ce chapitre nous étudierons les modifications de ce métabolisme chez les rats parasités par Plasmodium berghei et comparativement chez des animaux non impaludés de même origine et de même poids. Les métabolites de la chloroquine ^{14}C ont été dosés uniquement dans les urines des animaux.

A - MODE OPERATOIRE

Nous avons utilisé 22 rats mâles Wistar âgés de 12 mois, de poids voisin de 400 g, répartis en deux lots égaux. Nous avons impaludé les animaux du premier lot alors que deux du deuxième lot restent sains. Nous avons injecté par voie intraveineuse 3 µCi de diphosphate de chloroquine ^{14}C à chaque animal sous un volume de 0,20 ml. Les urines ont été recueillies au bout de 24, 48, 72, 96 et 168 heures. Les techniques utilisées ont été décrites dans le Chapitre III.

Nous avons divisé ce chapitre-ci en deux parties, l'une traitant de la mesure de la radioactivité dans les urines, l'autre, de l'analyse qualitative des métabolites urinaires par chromatographie sur couche mince.

- Détermination de la quantité de radioactivité excrétée dans les urines

Nous avons déterminé la quantité de chloroquine ^{14}C exprimée en radioactivité contenue dans les urines prélevées de 0 à 24, de 24 à 48, de 48 à 72, de 72 à 96 et de 96 à 168 heures. Chaque échantillon d'urine est amené à un volume de 10 ml ; et à 0,50 ml de cette dilution sont ajoutés dans l'ordre, 6 ml d'alcool absolu et 12 ml de liquide scintillant.

- Résultats

Les résultats de notre étude sont résumés dans les tableaux X.1 et X.2.

L'analyse de ces tableaux indique que l'excrétion urinaire de la chloroquine se poursuit suivant des modalités très proches chez les rats sains et impaludés puisque l'on trouve un taux d'excrétion correspondant à 10 °/₀ de la quantité injectée dans les urines de 24 heures chez les animaux des deux groupes. Cette excrétion est abaissée à 2,5 et 4 °/₀ dans les 24 heures suivantes. La diminution progressive de l'excrétion urinaire ressort de l'examen de la figure X 1 qui se prête à une transformation semi-logarithmique (figure X-2), laquelle fournit une courbe mono-exponentielle de formule générale :

$$y = A_o e^{-\lambda t}$$

dans laquelle A_o représente le compartiment urinaire initial d'élimination de la chloroquine, λ le coefficient d'excrétion urinaire de cette drogue hors de ce compartiment, t le temps exprimé en jours.

L'analyse des courbes nous a fourni le même résultat pour les animaux non impaludés et les impaludés :

$$U_n = 20\ e^{-0,693\ t}$$

Cependant, alors que chez les rats normaux les pourcentages d'excrétion urinaire s'alignent parfaitement selon une droite semi-logarithmique, chez les rats impaludés, on note d'après le tableau X.1 une excrétion urinaire irrégulière, avec des rétentions plus importantes le lendemain, suivies d'excrétion urinaire plus faible.

Comme l'étude a été effectuée sur peu de jours, il est possible que nous n'ayons pas observé une exponentielle à temps long dont la période biologique pourrait dépasser la durée de notre propre expérience.

Sur la figure X.2 les cercles blancs représentent les points expérimentaux obtenus chez les rats impaludés et les triangles sombres, ceux des animaux non impaludés.

B - ETUDE DES METABOLITES URINAIRES

Notre étude s'est poursuivie en deux étapes : l'extraction des métabolites, leur séparation et leur révélation chromatographique.

1 - Extraction des métabolites urinaires

Deux ml de l'urine diluée prélevée à chaque temps sont mélangés à 4 ml d'un solvant non miscible, le dichloréthane. Après une agitation vigoureuse, l'émulsion est détruite par addition de 4 ml de n butanol, et la phase organique séparée. Les solvants organiques sont évaporés et lé résidu repris par 2 ml de méthanol.

TABLEAU X.1

Excrétion urinaire de la chloroquine chez les rats impaludés

La radioactivité est exprimée en cpm dans l'urine collectée

Rat n°	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h	96-168 h
1	473 700	177 760	107 853	50 244	54 376
2	211 960	42 106	59 230	38 101	36 150
3	418 972	178 103	74 827	37 721	25 653
4	193 255	31 342	41 832	36 375	25 512
5	468 114	1 467	103 387	56 246	58 709
Moyenne	343 200	86 155	77 425	43 737	40 080
Ecart-type de la moyenne	52 115	34 129	11 532	3 592	6 300
Pourcentage de la radioactivité détectée par rapport à la quantité de radioactivité injectée	10,3	2,5	2,3	1,3	1,2

TABLEAU X. 2

Excrétion urinaire de la chloroquine ^{14}C chez les rats non impaludés

La radioactivité est exprimée en cpm dans l'urine collectée

Rat n°	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-96 h	96-168 h
1	211 703	159 723	94 486	17 139	35 216
2	312 014	160 861	66 742	54 073	72 890
3	341 128		45 897	55 029	19 307
4	371 184		121 229	64 410	62 561
5	457 053	149 646	59 286	65 034	35 901
Moyenne	338 616	156 743	77 528	51 137	45 175
Ecart-type sur la moyenne	35 823	2 913	12 110	7 892	8 798
Pourcentage de la radioactivité détectée par rapport à la quantité de radioactivité injectée	10, 1	4, 7	2, 3	1, 5	1, 3

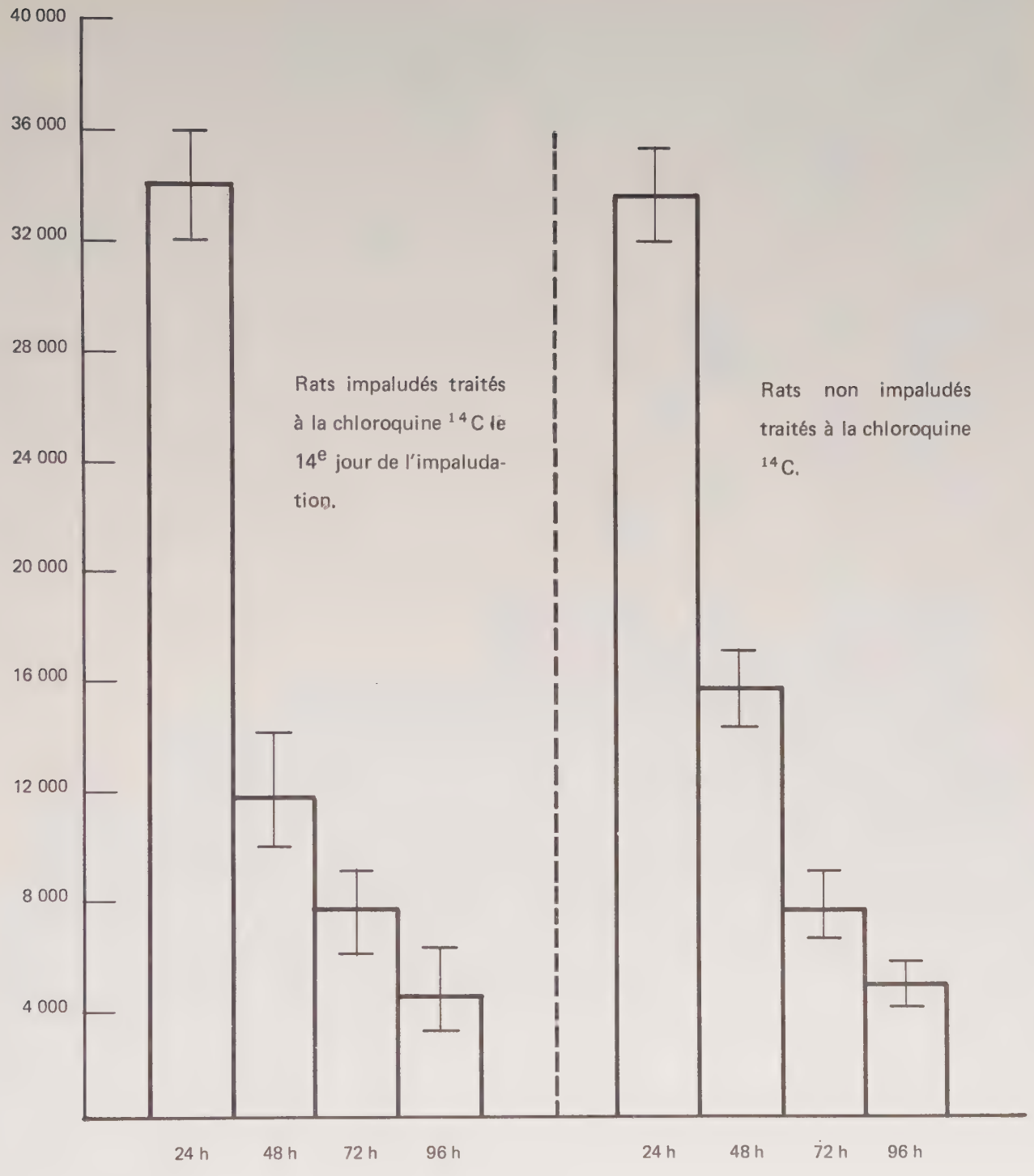


Figure X - 1

EXCRETION URINAIRE CHEZ LES RATS SAINS
ET CHEZ LES RATS IMPALUDES

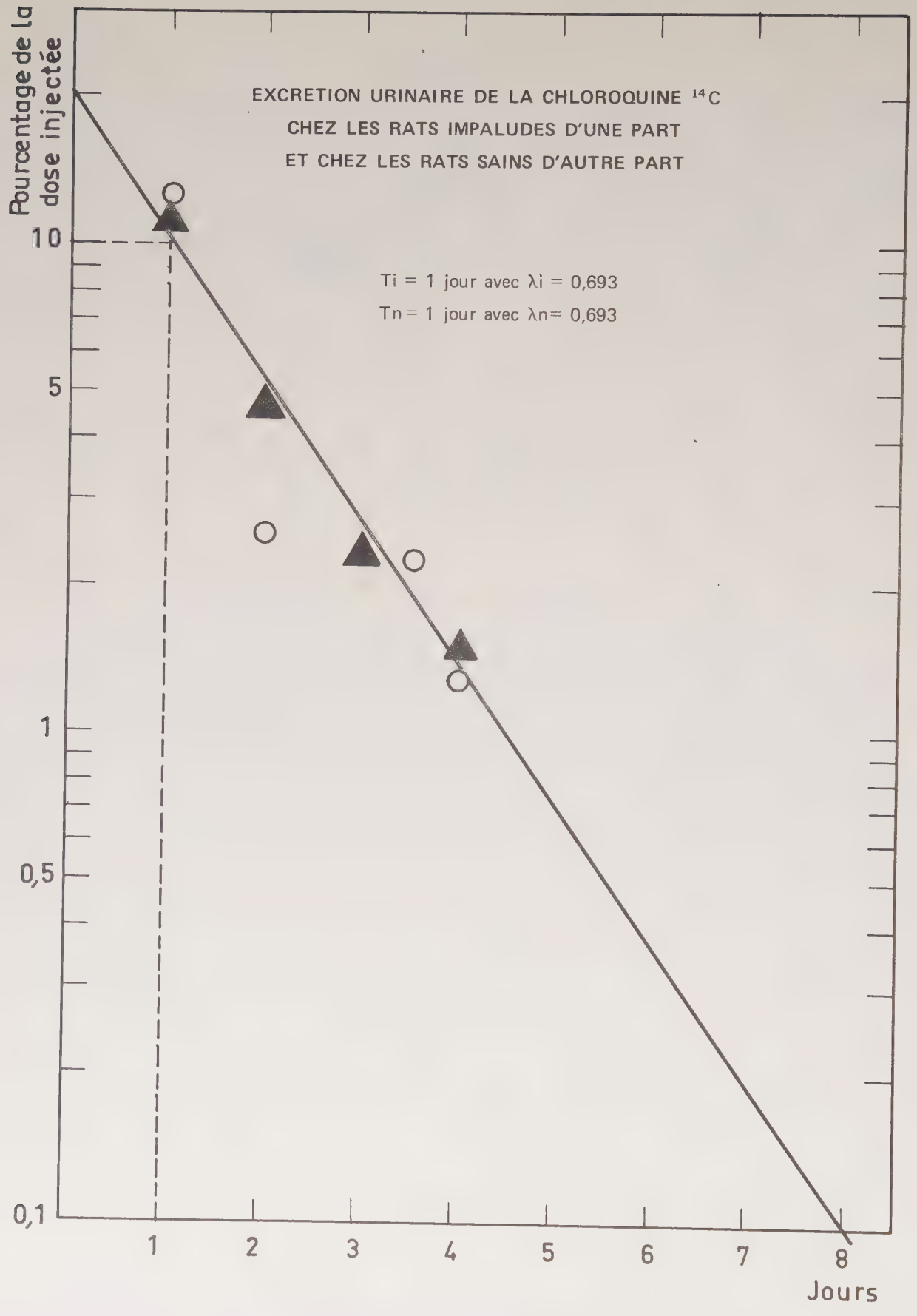

EXCRETION URINAIRE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C
CHEZ LES RATS IMPALUDES D'UNE PART
ET CHEZ LES RATS SAINS D'AUTRE PART
Ti = 1 jour avec λi = 0,693
Tn = 1 jour avec λn = 0,693
Pourcentage de la dose injectée
10
5
1
0,5
0,1
1
2
3
4
5
6
7
8
Jours

Figure X - 2

2 - Séparation chromatographique

2 µl de solution méthanolique sont déposés de 2 en 2 cm le long d'une ligne tracée sur une plaque chromatographique Silicagel F 254, selon la technique décrite au Chapitre III.

Nous avons opéré sur deux séries de 5 chromatoplaques, l'une pour les rats impaludés, l'autre pour les rats sains. Une solution de 0,01 µCi/ml de chloroquine ^{14}C nous a servi de témoins. Le solvant utilisé est constitué par : Acétate d'éthyle, Isopropanol, Ammoniaque à 20 °/₀ (79 : 15 : 6).

3 - Révélation des chromatogrammes

Il n'a pas été possible de révéler la présence des chromatogrammes par le réactif à l'iodoplatinate et le réactif de DRAGENDORFF même après pulvérisation sur les chromatoplaques d'une solution d'acide orthophosphorique 38 N. Cependant les métabolites ont pu être révélés par la fluorescence violette qu'ils présentent sous rayonnement ultra-violet. Grâce à l'aide de Messieurs HERBERT et MESTRE, au Service des Molécules Marquées au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, nous avons obtenu les images reproduites sur la figure X-3 avec les urines de rats impaludés et de rats sains.

1) Le témoin a fourni deux taches de Rf différent : 0,90 pour la chloroquine base et 0,60 pour la chloroquine diphosphate (HERBERT et MESTRE, Communication personnelle).

2) Du premier au troisième jour, on trouve principalement deux métabolites, l'un ne migrant pas, l'autre de Rf 0,20.

3) Dans les prélèvements du 4ème jour, on voit apparaître un troisième métabolite de Rf 0,40.

4) Sur les prélèvements tardifs apparaît, en plus des métabolites déjà cités, la chloroquine à l'état de sel.

Nous avons retrouve les mêmes métabolites urinaires chez les rats non impaludés.

La chloroquine ^{14}C, injectée par voie intraveineuse aux rats impaludés ou non impaludés, est excrétée dans les urines sous une forme métabolisée.

La dégradation en métabolites paraît décroître avec le temps ; après 96 et 168 heures, la chloroquine ^{14}C serait excrétée non dégradée en même temps que les produits secondaires dus à sa métabolisation partielle. Son élimination urinaire paraît très faible chez les rats.

Le métabolisme de la chloroquine ^{14}C chez le Rat paraît différent de celui des singes femelles rhésus et de l'écureuil. En effet, CHESNEY et collaborateurs (1967) ont étudié chez ces animaux le métabolisme de cette drogue dont 48 à 62 °/₀ seraient excrétés dans les urines au bout de 96 heures, après une injection intra-musculaire d'une dose de 4 mg/kg, et 2 °/₀ par les fécès. Les mêmes auteurs ont remarqué qu'une partie de cet anti-paludique de synthèse est excrétés sous forme non transformée dans les urines des animaux, comme nous l'avons constatée chez les rats.

N.B. - La chloroquine ^{14}C étant difficile à obtenir sur le marché national et international, nous ne pûmes utiliser autant d'animaux que nous l'aurions souhaité.

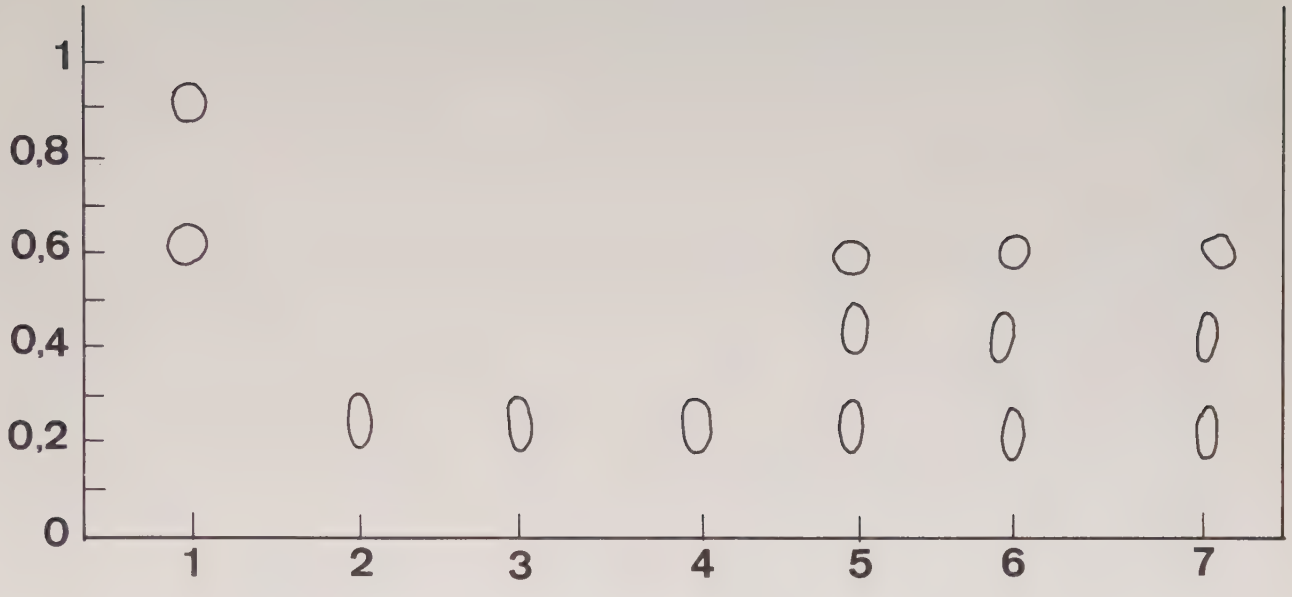


Figure X-3 - Plages de fluorescence sous U.V. des chromatographies sur couche mince d'urine de rats impaludés ou sains soumis à la chloroquine ^{14}C.

1 - Solution témoin de chloroquine ^{14}C
2 - Urine de 0 à 24 heures
3 - Urine de 24 à 48 heures
4 - Urine de 48 à 72 heures
5 - Urine de 72 à 96 heures
6 - Urine de 96 à 168 heures.

CHAPITRE XI

CINETIQUE SANGUINE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C CHEZ LE RAT NORMAL ET CHEZ LE RAT IMPALUDE

L'étude qualitative et quantitative de la fixation de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme des animaux sains et des animaux impaludés nous a permis de connaître les organes "cibles" de cette drogue. Dans ce chapitre, nous souhaiterions savoir avec quelle vitesse cet antipaludique de synthèse décroît dans le sang en se fixant sur le foie, la rate, les reins, les glandes lacrymales, les poumons, les glandes salivaires, etc.., et si cette épuration sanguine obéit à une loi cinétique comparable à celles qui ont été établies avec les radiocolloïdes par COHEN et Collaborateurs (1967) ; en effet, de leur étude et tant d'autres travaux sur les radioéléments dont l'énumération nous paraît inopportune, il ressort que tout radioisotope introduit dans l'organisme subit à la fois une décroissance radioactive et une élimination biologique.

Dans le cas de notre étude, la période radioactive ou période physique de la chloroquine ^{14}C est celle du carbone 14, soit Tr = 5 568 ans ; les temps de nos mesures étant en minutes, nous avons :

$$Tr = 5\,568 \times 12 \times 24 \times 60 = 29.10^8$$

Cette période est liée à la période biologique et à la période effective Te par une relation simple :

$$\frac{1}{Te} = \frac{1}{Tr} + \frac{1}{Tb} = \frac{1}{29 \cdot 10^8} + \frac{1}{Tb}$$

Le terme $\frac{1}{29.10^8}$ est très faible, de l'ordre du milliardième de minute ; il est pratiquement négligeable dans le contexte de notre étude et $\frac{1}{Te} = \frac{1}{Tb}$.

Ceci entraîne : Te = Tb.

Nous essaierons de déterminer la période biologique de la chloroquine chez les animaux impaludés et chez les animaux non impaludés, avec le seul souci d'avoir une idée sur l'index épurateur de l'organisme des rats, en fonction de la période biologique Tb.

- MODE OPERATOIRE

Nous avons utilisé 8 rats mâles de souche Wistar, de poids moyen de 400 g. Nous avons injecté 6 µCi par rat et sous un volume de 0,20 ml, la voie d'injection étant la veine du pénis. Nous avons gardé les rats à une température constante de 37°C au moyen du système de chauffage Rozé. Nous avons fait des prélèvements de sang au bout de 5, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes.

La technique de prélèvements du sang chez tous les animaux et la méthode de mesure de la radioactivité contenue dans 100 µl de sang recueilli, ont été décrites dans le Chapitre III.

- RESULTATS

Nous avons résumé les résultats de notre expérience dans les tableaux XI.1 et XI.2.

Les pourcentages de radioactivité détectée dans un ml de sang par rapport à la radioactivité totale injectée sont de 0,1 dans les 5 premières minutes, 0,08 pour les 10 minutes suivantes. Ils continuent de décroître de 0,07 à 0,02 pour les animaux impaludés ; chez les rats non impaludés, nous avons noté comme pourcentages : 0,09 pour les 5 premières minutes puis, des valeurs décroissantes allant de 0,07 à 0,02.

Nous avons reporté nos points expérimentaux sur un papier semi-logarithmique avec en abscisses, les temps de prélèvements en minutes, et en ordonnées, les pourcentages de la dose injectée.

L'analyse des courbes obtenues nous a donné deux droites dans les deux groupes d'animaux. La cinétique sanguine de la chloroquine ^{14}C se ferait donc suivant des exponentielles de formule générale $Y = N e^{-\lambda t}$ dans laquelle N représenterait la radioactivité initiale injectée; λ, le coefficient d'épuration et t, le temps exprimé en minutes.

Pour la clarté de l'analyse de nos courbes, nous avons défini les paramètres de chaque série d'animaux comme suit : Ni (1) et Ni (2), λ_i (1) et λ_i (2), Vdi (1), Vdi (2), représentent la radioactivité initiale, les coefficients d'épuration sanguine, les volumes de distribution pour les rats impaludés, et Nn (1), Nn (2), λ_n (1), λ_n (2), Vdn (1), Vdn (2) pour les animaux non impaludés. Dans la série des rats impaludés, les exponentielles peuvent se calculer par les équations suivantes :

$$S_i = N_{i\,(1)}\, e^{-\lambda_{i\,(1)}\, t} + N_{i\,(2)}\, e^{-\lambda_{i\,(2)}\, t}$$

Sur la figure XI-1, nous avons déterminé graphiquement, T_i (1) = 5 minutes et T_i (2) = 70 minutes ; nous avons calculé $\lambda_{1\,(1)}$ et $\lambda_{1\,(2)}$ par la relation :

$$\lambda_{1\,(1)} = \frac{0,693}{t} = \frac{0,693}{5} = 0,14$$

TABLEAU X.1

Cinétique du taux sanguin de la chloroquine marquée
au Carbone 14 chez le rat impaludé

Quantité de radioactivité détectée dans 100 µl de sang

	Rats n°	5 mn	10 mn	15 mn	30 mn	60 mn	120 mn
Radioactivité expérimée en c.p.m.	1	1 044	1 294	584	728	359	240
	2	1 852	1 101	904	688	451	
	3	1 238	731	1 288	468	665	
Moyenne		1 378	1 042	925	628	491	240
Ecart-type sur la moyenne		243	165	203	80	90	
Pourcentage de radioactivité détectée par rapport à la radioactivité totale injectée, et par ml de sang mesuré		0,1	0,08	0,07	0,05	0,04	0,02

TABLEAU XI. 2

Cinétique du taux sanguin de la chloroquine marquée
au Carbone 14 chez le rat non impaludé

Quantité de radioactivité détectée dans 100 ml de sang

	Rats n°	5 mn	10 mn	15 mn	30 mn	60 mn	120 mn
Radioactivité exprimée en c.p.m.	1	1 469	1 116	854	611	481	343
	2	1 095	838	592	480	480	314
	3	1 102	793	604	446	319	274
Moyenne		1 222	915	683	512	426	310
Ecart-type sur la moyenne		123	101	85	50	53	20
Pourcentage de radioactivité détectée par rapport à la radioactivité totale injectée, et par ml de sang mesuré		0, 09	0, 07	0, 05	0, 04	0, 03	0, 02

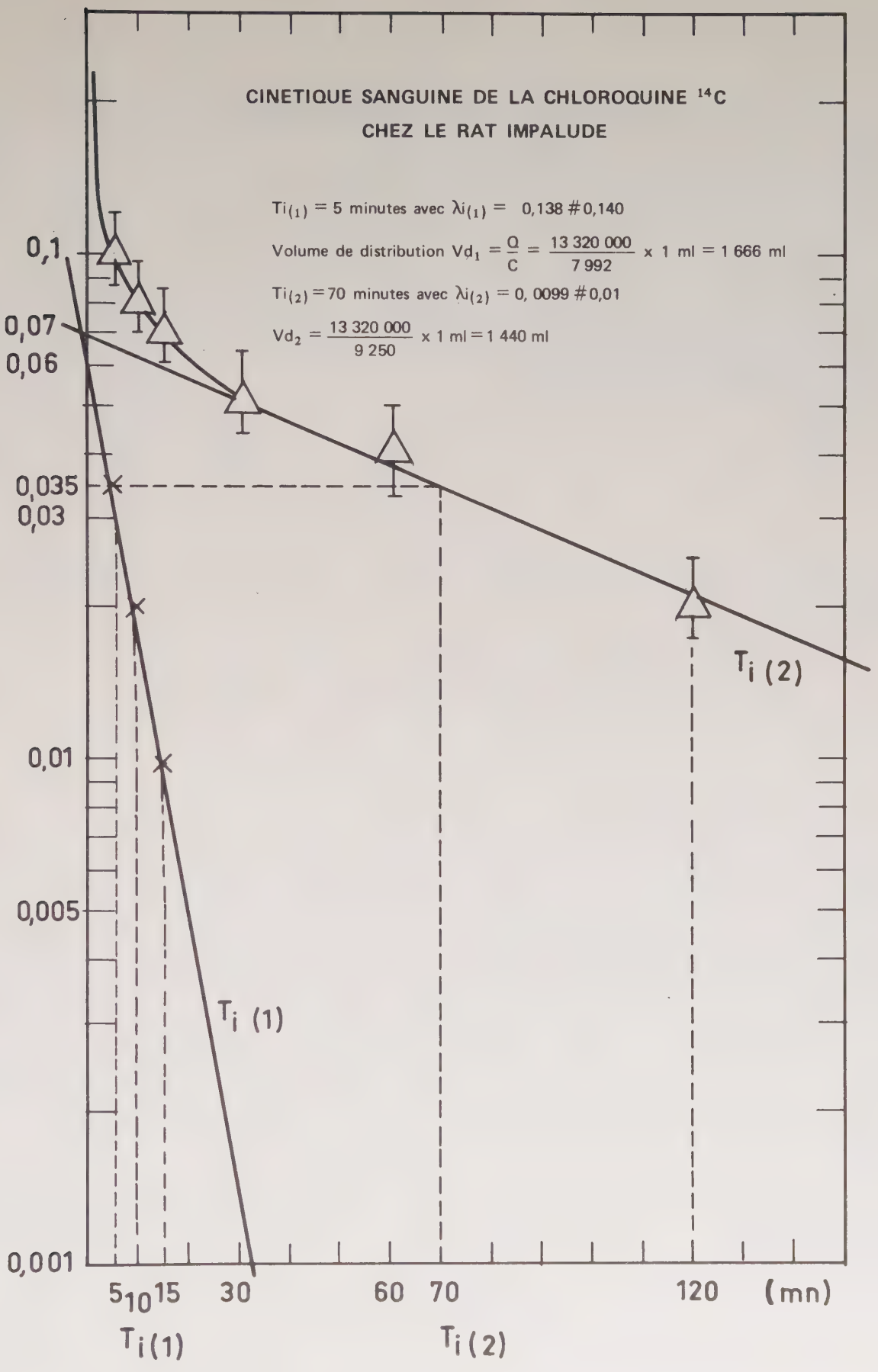

CINETIQUE SANGUINE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C
CHEZ LE RAT IMPALUDE
$Ti_{(1)}$ = 5 minutes avec $\lambda i_{(1)}$ = 0,138 # 0,140
Volume de distribution $Vd_1 = \frac{Q}{C} = \frac{13\,320\,000}{7\,992}$ x 1 ml = 1 666 ml
$Ti_{(2)}$ = 70 minutes avec $\lambda i_{(2)}$ = 0, 0099 # 0,01
$Vd_2 = \frac{13\,320\,000}{9\,250}$ x 1 ml = 1 440 ml
0,1
0,07
0,06
0,035
0,03
0,01
0,005
0,001
T_i (2)
T_i (1)
5 10 15 30 60 70 120 (mn)
$T_i(1)$
$T_i(2)$

Figure XI - 1

$$\lambda_{1\ (2)} = \frac{0,693}{70} = 0,01$$

Ni (1) et Ni (2) ont été déterminés graphiquement et sont égaux à Ni (1) = 0,06 et Ni (2) = 0,07.

L'équation de l'exponentielle pourrait s'écrire :

$$Si = 0,06\ e^{-\ 0,14\ t} + 0,07\ e^{-\ 0,01\ t}$$

Nous avons calculé les volumes de distribution sanguine de la chloroquine ^{14}C par la relation $V_d = \frac{Q}{c}$ où Q représente la quantité de chloroquine ^{14}C administré au temps zéro et c la concentration initiale en µCi par ml.

$$Q = 2\ 220\ 000 \text{ cpm } x\ 6 = 13\ 320\ 000$$

$$1\ \mu Ci = 2\ 220\ 000 \text{ cpm.}$$

Ci (1) = 7 992 cpm et Ci (2) = 9 250 cpm par ml

Ci (1) et Ci (2) ont été calculés à partir des pourcentages des concentrations déterminés sur le graphique XI-1.

Nous avons trouvé 1 666 ml pour Vdi (1) et 1 440 ml pour Vdi (2).

Nous avons fait de même avec les animaux non impaludés, figure XI-2.

L'exponentielle définissant la cinétique sanguine de la chloroquine peut se calculer par la relation :

$$Sn = 0,1\ e^{-\ 0,14\ t} + 0,05\ e^{-\ 0,008\ t}$$

Nous trouvons 1 000 ml pour Vdn (1) et 1 950 ml pour Vdn (2).

L'examen attentif de ces résultats nous montre que le temps de mélange de la chloroquine dans le sang est le même chez les animaux sains. La répartition, la fixation ou l'épuration sanguine, se font plus rapidement chez les rats impaludés que chez les non impaludés, les valeurs étant de $T_i = 70$ minutes pour les premiers et de $T_n = 86$ minutes pour les seconds. Par contre, le volume de distribution de 1 950 ml chez les animaux normaux est plus élevé que chez les impaludés dont la valeur n'est que 1 440 ml. Un volume apparent de distribution aussi important implique une liaison très forte de la chloroquine a des constituants cellulaires que nous pensons être les acides nucléiques puis KRAMER et coll. (1971) ont constaté une fixation sur la membrane et le noyau des hématozoaires et que nous-mêmes avons observé une charge hépatique, splénique et salivaire remarquable.

Dans les deux groupes d'animaux, le mélange se fait avec les mêmes coefficients d'épuration ; $\lambda_{i\ (2)} = 0,01$ pour les animaux impaludés et $\lambda_{n\ (2)} = 0,008$ chez les normaux. Nous constatons que

$$\frac{\lambda_{n\ (2)}}{\lambda_{i\ (2)}} = \frac{4}{5}$$

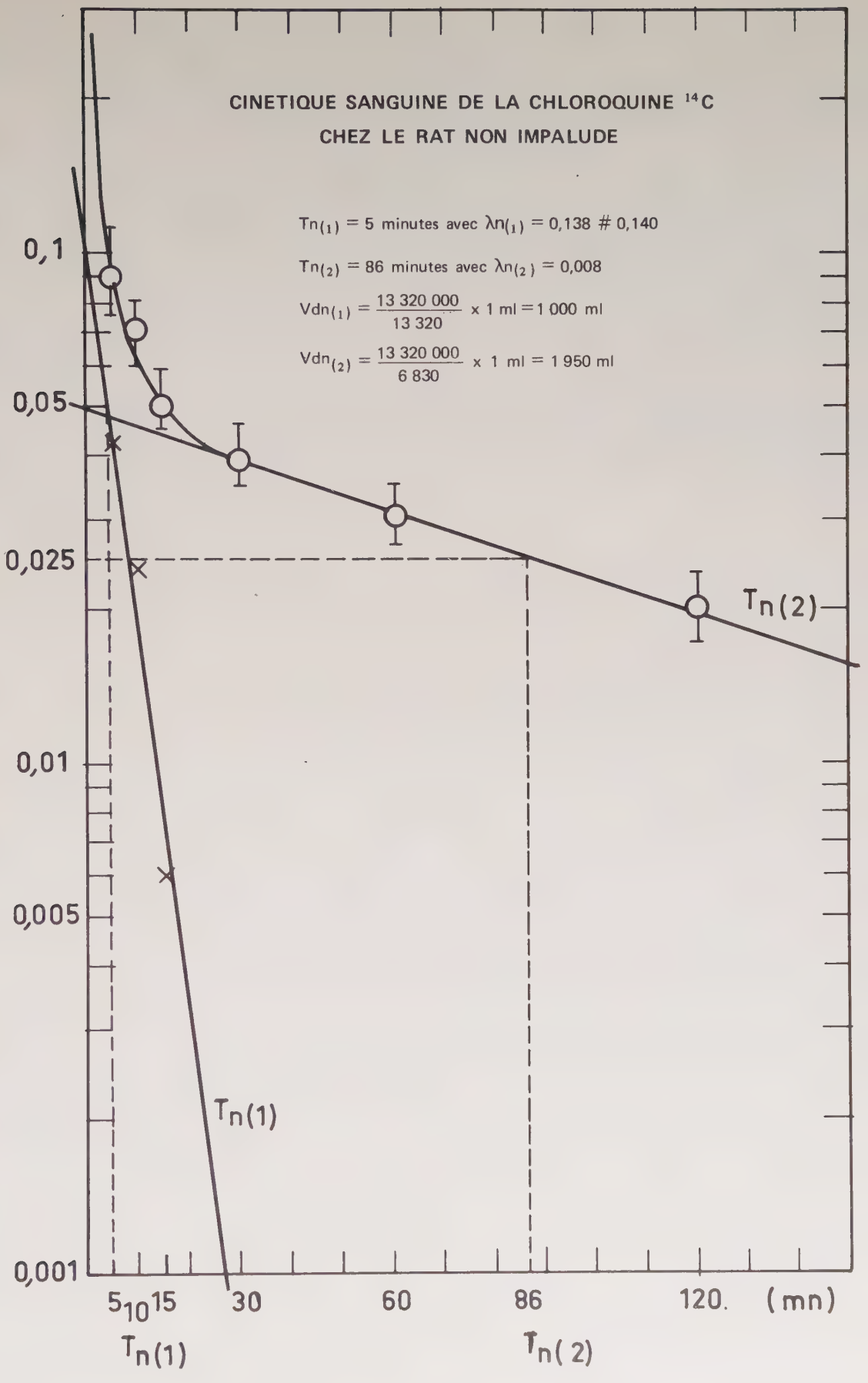

CINETIQUE SANGUINE DE LA CHLOROQUINE ^{14}C
CHEZ LE RAT NON IMPALUDE
$Tn_{(1)}$ = 5 minutes avec $\lambda n_{(1)}$ = 0,138 # 0,140
$Tn_{(2)}$ = 86 minutes avec $\lambda n_{(2)}$ = 0,008
$Vdn_{(1)} = \frac{13\,320\,000}{13\,320} \times 1\ ml = 1\,000\ ml$
$Vdn_{(2)} = \frac{13\,320\,000}{6\,830} \times 1\ ml = 1\,950\ ml$
0,1
0,05
0,025
0,01
0,005
0,001
Tn(2)
Tn(1)
5 10 15 30 60 86 120. (mn)
Tn(1)
Tn(2)

Figure XI - 2

Le coefficient d'épuration sanguine chez les animaux normaux n'est que les 4/5 de celui des rats impaludés. Un organisme impaludé traité avec un antipaludique comme la chloroquine, épure son sang plus vite qu'un organisme sain ayant reçu la même drogue.

CHAPITRE XII

DISCUSSION GENERALE

L'étude du sort de la chloroquine ^{14}C dans l'organisme-élimination, rétention et fixation élective sur certains organes, cinétique sanguine chez la Souris et le Rat sains ou impaludés, soulève un certain nombre de problèmes que nous allons essayer d'analyser dans ce dernier chapitre.

1°- L'étude de la distribution de la chloroquine ^{14}C chez les souris saines et les souris impaludées a montré que cette drogue se fixait électivement sur le foie, la rate, les reins, les poumons, les glandes salivaires, le liquide céphalo-rachidien, pour ne citer que les principaux lieux de dépôt ; il est difficile de dire que ces organes fixent davantage de chloroquine chez l'animal impaludé que chez l'animal sain. Nous nous sommes posé la question de savoir comment des sujets malades, traités aux antipaludiques et guéris, font des rechutes quelque temps plus tard, lorsqu'ils ne sont plus en zone endémique alors que la chloroquine s'est fixée sur le foie. Si les hématozoaires du paludisme se trouvaient dans le foie sous une forme sensible à la chloroquine, ils devraient alors être tués, à moins que dans la phase exo-érythrocytaire du cycle plasmodial, le parasite devienne résistant à la chloroquine ou de l'athrocytose de ce composé par les cellules de KUPFFER, en l'enlevant du courant sanguin, mette le Plasmodium à l'abri de l'action de la drogue ou, enfin, que la chloroquine se fixe sur le foie, en perdant ses propriétés antipaludiques, ceci supposant que les Plasmodiums transitent effectivement par cet organe.

2°- Nos coupes de souris in toto avaient 30 µ d'épaisseur ; la structure cellulaire de chaque coupe de tissu était donc difficilement observable ; poursuivant notre étude au niveau des cellules hépatiques et spléniques, nous avons fait des coupes de 5 µ dans chacun de ces deux organes. Nous notons une radioactivité intense au niveau des cellules de ces deux organes, aussi bien chez les animaux impaludés que les animaux non impaludés. La différence de concentration de grains d'argent sur les deux séries de foies et de rats est très minime. Nous savons que la rate est le lieu de dépôt des hématies dégradées ou en voie de destruction ; cet organe contient donc de nombreux Plasmodiums. Mais, le foie et la rate sont aussi le siège de l'élaboration des lymphocytes, éléments nucléés. LATASTE et FARINAUD (1939), et des auteurs anglo-saxons, ont montré que les leucocytes concentrent deux cents fois plus de substance antipaludique comme la quinacrine, que le plasma. La concentration de chloroquine notée au niveau de ces deux or-

ganes n'est pas due seulement à la présence du Plasmodium. Nous n'avons donc pas plus de précision sur le mode de fixation de cette drogue au niveau des organismes impaludés avec la méthode d'autohistoradiographie qu'avec l'autoradiographie vue au chapitre précédent.

3°- L'étude quantitative de la répartition tissulaire de la chloroquine ^{14}C en fonction du temps chez les animaux sains et impaludés ne donne pas non plus des résultats très concluants ; toutefois, il semble que le foie, la rate, les reins et les poumons fixent davantage de drogue chez les animaux impaludés que chez les animaux sains ; et nous avons trouvé une différence significative de concentration de chloroquine entre les sangs des deux sortes d'animaux, comme nous l'avons montré dans le Chapitre VII. Mais, cette différence n'est significative qu'avec une probabilité $P = 0,2$ soit 20 °/₀ au temps de six heures d'observation ; par contre, au temps de 48 heures de survie, la différence est bien significative avec une probabilité de 0,001 soit de 0,1 °/₀. Donc il semble qu'aux temps de 0 à 6 heures, le sang impaludé contienne moins de radioactivité, donc moins de chloroquine que le sang non impaludé. Cette différence de concentration tendrait au bout de 6 heures vers une certaine limite à partir de laquelle, le sang impaludé concentrerait davantage de chloroquine ^{14}C que le sang non impaludé. Tout se passerait comme si cette drogue était captée à partir du sang par d'autres systèmes jusqu'à saturation de ces derniers et si un certain équilibre s'établissait progressivement entre la chloroquine fixée et la chloroquine circulante.

4°- Pour obtenir plus de précision sur la distribution de la chloroquine dans le sang, nous avons fait des autoradiographies de coupes de culot sanguin et nous avons trouvé que la presque totalité de cette drogue était fixée sur les leucocytes ; au niveau des hématies et du plasma d'animaux sains ou impaludés, nous n'avons relevé qu'une faible radioactivité bien que les hématies fussent massivement infestées par les hématozoaires ; nous pensions trouver davantage de radioactivité dans la couche de globules rouges infestés que dans les autres éléments, ou tout au moins, une concentration égale à celle des leucocytes, car, des travaux antérieurs ont prouvé que cette drogue se fixait sur les cellules nucléées. Plusieurs explications peuvent être invoquées à ce propos. La cloroquine ne peut pas pénétrer à l'intérieur des hématies parasitées alors qu'elle peut se fixer sur les Schizontes libérés par éclatement de ces globules rouges. L'affinité des constituants nucléaires des Schizontes pour la chloroquine ^{14}C n'est pas suffisante pour que cette drogue traverse les deux barrières qui constituent la membrane de l'hématie, puis celle de l'hématozoaire. Afin de préciser la nature des sites de liaison de la chloroquine avec le Plasmadium, KRAMER et MATUSIK (1971) ont procédé à une double lyse s'adressant d'abord aux hématies parasitées, puis aux parasites seuls, chacune de ces opérations étant suivie d'une centrifugation. Faisant agir la chloroquine sur les culots obtenus ils ont constaté, comme nous l'avons dit plus haut, que cet antipaludique se fixait sur la membrane cytoplasmique et dans le noyau du parasite. L'examen de frottis de sang d'animaux impaludés et non impaludés au microscope optique, à éclairage classique ou à éclairage aux halogènes, ne nous a pas permis de déceler de dépôts de grains d'argent sur les cellules sanguines ni sur les Plasmodiums, la gélatine nucléaire ayant été utilisée sous différentes dilutions (1/3 puis 1/2).

5°- Il est important de savoir dans quelle mesure la présence des hématozoaires du paludisme influe sur le métabolisme et l'excrétion urinaire de la chloroquine ^{14}C chez le rat.

a) Les métabolites détectés par éclairage aux U.V. de chromatogrammes en couche mince obtenus à partir d'extraits urinaires sont les mêmes pour les animaux impaludés et pour les non impaludés. Sur les urines de 24 à 72 heures, nous avons noté un seul métabolite radioactif de Rf = 0,40 dans le solvant utilisé ; dans les urines de 96 à 168 heures, nous avons noté, en plus de ce métabolite, la présence de chloroquine non transformée de Rf = 0,60 et d'un autre métabolite de Rf compris entre 0,40 et 0,60. Ces métabolites seraient-ils doués ou non de l'activité de la vhloroquine ? Nous ne pouvons répondre à cette question car, nous n'avons pas disposé d'une quantité suffisante de ces métabolites urinaires pour effectuer des essais significatifs sur le plan pharmacologique.

b) Nous avons analysé sur papier semi-logarithmique, les courbes exprimant en fonction du temps l'excrétion urinaire de la chloroquine ^{14}C chez les animaux impaludés et chez les non impaludés ; elles présentent une allure monoexponentielle ; nous trouvons la même valeur de la période biologique de cette drogue chez ces deux groupes d'animaux ; en conséquence, nous sommes conduits à admettre que la présence de Plasmodium dans un organisme n'influe pas sur la vitesse d'excrétion urinaire de la chloroquine, ni sur la nature chimique de ses métabolites dans les limites de la durée de notre observation.

6°- Nous avons constaté que la vitesse d'excrétion urinaire de la chloroquine était uniforme ; qu'en est-il au niveau du sang total in vivo, impaludé ou non impaludé ?

Les courbes exprimant en coordonnées semi-logarithmiques la cinétique sanguine de la chloroquine ^{14}C chez les animaux impaludés et les animaux sains, se présentent sous la forme de deux exponentielles dont les périodes biologiques sont pour les animaux impaludés : $T_{i\,(1)} = 5$ minutes . $T_{i\,(2)} = 70$ minutes ; pour les animaux sains : $T_{n\,(1)} = 5$ minutes . $T_{n\,(2)} = 86$ minutes ; les coefficients d'épuration sont : $\lambda_{i\,(1)} = 0,140$ et $\lambda_{i\,(2)} = 0,010$ pour les animaux impaludés et $\lambda_{n\,(1)} = 0,140$, $\lambda_{n\,(2)} = 0,008$ pour les non impaludés.

A la suite de l'injection de chloroquine, il y aurait une fixation de ce composé dans le sang d'une part et dans les hépatocytes d'autre part. Dans le sang, la fixation de la chloroquine ^{14}C s'effectuerait sur les Schizontes, et les mérozoïtes à l'état libre ou dans les hématies hypertrophiées. La chloroquine serait ensuite éliminée du sang vers la rate où s'effectue la destruction des hématies. Dans le sang impaludé, les fonctions d'épuration seraient exaltées ; le taux de fixation de cette drogue se trouverait accru sur les organes-cibles.

CONCLUSION

Nous avons cherché dans ce travail à préciser le sort de la chloroquine chez l'animal impaludé par comparaison à l'animal sain.

En effet, dans de nombreuses régions du monde, de grands efforts sont faits pour assurer l'eradication du paludisme par une action écologique et par une action prophylactique. Or il est apparu que la chloroquine, largement utilisée dans un but prophylastique et thérapeutique, entraînait l'apparition de souches de Plasmodium résistant à son action.

Nous nous sommes demandé si, grâce à l'étude de la distribution et du métabolisme de la chloroquine chez l'animal, nous arriverions à expliquer ou tenter d'expliquer la manifestation de cette résistance.

Une telle étude ne pouvait nous laisser indifférent, puisqu'elle rejoignait les préoccupations des autorités gouvernementales Mondiales et particulièrement de l'Afrique et de l'Asie du Sud-Est où le paludisme continue de sévir.

Après avoir rappelé dans les chapitres introductifs l'importance du Plasmodium dans la pathogénie malarique, les méthode d'étude en Parasitologie expérimentale et les moyens et procédés en usage en chimie nucléaire et en radiobiologie, nous avons rapporté les résultats de nos propres travaux effectués avec de la chloroquine marquée au carbone 14. Cette recherche nous a obligé à mettre en oeuvre des techniques aussi diverses que la transmission du Plasmodium de la Souris au Rat avec numération des hématies infestées ou le comptage de la radioactivité dans le sang de l'animal impaludé ou encore la séparation chimique des métabolites urinaires de la chloroquine en passant par l'autoradiographie et l'autohistoradiographie.

Avant d'aborder l'étude de la chloroquine ^{14}C nous avons recherché la dose létale 50 de cette substance chez la Souris normale et impaludée : administrée par voie intraveineuse, la DL 50 est de $26 \pm 0,14$ mg/Kg chez la Souris normale et de $28 \pm 0,14$ mg/Kg chez la Souris impaludée ; par voie intrapéritonéale les doses létales respectives sont : $80 \pm 0,17$ mg/Kg et $64 \pm 0,17$ mg/Kg. Les souris non impaludées paraissent mieux supporter la chloroquine que les souris infestées, lorsque celle-ci est donnée par voie intrapéritonéale.

Or, nous observons par autoradiographie de la Souris entière, que la distribution du traceur après administration intraveineuse de 89 microgrammes (2 μCi) pour un animal de 20 grammes, est sensiblement identique chez l'impaludé et l'animal sain. La fixation affecte par

ordre d'intensité le foie, la rate, les reins, les poumons, les glandes lacrymales. Le liquide céphalo rachidien, les os, la thyroïde, la lumière intestinale sont également radioactifs. Ceci prouve une distribution générale de la chloroquine, le franchissement de la barrière hémato-méningée et l'élimination intestinale après excrétion biliaire. Cette dernière suppose un transfert dans l'hépatocyte du pôle sanguin vers le pôle biliaire. Effectivement nous avons noté, par autoradiographie, la présence du traceur dans le foie de rats sains ou impaludés. Une même présence est remarquée dans la rate des animaux sains et infestés. Indépendamment donc de la présence des hématozoaires, les cellules spléniques révèlent une certaine affinité à l'égard de la chloroquine.

Après avoir estimé par une étude qualitative autoradiographique, à l'échelle cellulaire et sur le corps entier de la Souris, la distribution de la chloroquine, nous avons procédé à une étude quantitative de la distribution du traceur chez le même animal. L'injection intraveineuse détermine d'emblée une forte concentration de carbone 14, vraisemblablement de chloroquine, dans le foie, les reins, les surrénales, la rate et les poumons. Cette concentration tend à décroître en fonction du temps comme nous l'ont montré les résultats des prélèvements effectués à 1 heure, 6 heure et 48 heures après administration de l'anti-paludique.

Les viscères (foie, reins, rate) des animaux impaludés sont plus radioactifs que ceux des animaux sains au temps de une heure, mais ensuite les différences s'atténuent pour les temps de 6 heures et de 48 heures.

A ce stade de notre recherche, il nous a paru utile d'étudier en fonction du temps le devenir de la chloroquine et d'entreprendre ainsi une investigation à caractère pharmacocinétique. Nous nous sommes adressé au Rat qui se prête plus facilement que la Souris aux prélèvements répétés de sang. Nous avons comparé la cinétique sanguine de la chloroquine chez le rat impaludé, en période d'état, et chez le rat sain. Deux périodes biologiques sanguines sont trouvées, l'une brève de 5 minutes chez les rats impaludés et chez les rats sains, l'autre longue de 70 minutes chez les impaludés et de 86 minutes chez les rats sains. En terme de cinétique, les courbes décrivant la concentration sanguine de la chloroquine en fonction du temps admettent les équations suivantes pour les rats normaux :

$$S_{(n)} = 0,1\ e^{-0,14\,t} + 0,05\ e^{-0,008\,t}$$

pour les rats impaludés :

$$S_{(i)} = 0,06\ e^{-0,14\,t} + 0,07\ e^{-0,01\,t}$$

Autrement dit, après une phase de répartition sanguine de la chloroquine, identique pour les animaux sains et impaludés, on observe un décours sanguin plus rapide chez les impaludés, que l'on peut attribuer à une affinité plus importante des tissus chez ces derniers, car le volume de distribution apparent de l'antipaludique est plus élevé (1 950 ml) que chez les normaux (1 000 ml).

La chloroquine se distribue dans le sang d'une façon hétérogène attestée par une étude auto-cytoradiographique chez la Souris et le Rat, les leucocytes sont bien plus riches en traceur que les hématies, normales ou impaludées et que le plasma sanguin.

La disparition plus rapide de la chloroquine hors du compartiment sanguin chez les rats impaludés ne paraît pas être associée à une excrétion urinaire plus importante car la cinétique d'élimination urinaire, monoexponentielle, dans le laps de temps de notre expérimentation, admet la même formulation mathématique :

$$U = 20\, e^{-0,693\, t}$$

pour les rats normaux et les impaludés. Toutefois l'élimination urinaire est moins régulière chez ces derniers. Celle-ci correspond à l'excrétion de chloroquine inchangée accompagnée de deux métabolites entre le premier et le troisième jour qui suit l'administration intraveineuse de chloroquine et d'un troisième métabolite qui apparaît dans les prélèvements urinaires du quatrième jour.

La quantité de chloroquine marquée dont nous disposions ne nous a pas permis, malheureusement, d'identifier ces métabolites.

L'ensemble de notre étude, imparfait et incomplet, par manque d'une quantité suffisante de molécule marquée, nous a conduit cependant à la conclusion que la chloroquine subissait le même sort chez l'animal normal et l'animal impaludé, mais avec des constantes de temps différentes, les animaux impaludés présentant une affinité plus grande pour l'antimalarique que les animaux sains. Les rongeurs étudiés, Souris et Rats, ne nous permettent pas d'inférer sans prudence sur ce qui se passe chez l'Homme. Toutefois, nous pensons avoir apporté notre contribution personnelle aux recherches nombreuses sur la chloroquine, car pour la première fois dans le monde, était abordée l'étude simultanée du devenir de cet antimalarique chez des mammifères sains et des mammifères en état de crise paludéenne. On pourrait rattacher aux différences observées, l'installation d'une résistance à la chloroquine.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ALBERT J., DIETZ Jr.
Metabolism of chloroquine-3-^{14}C in the rhesus monkey.
Biochem. Pharmacol. Vol. 16, pp. 2444 - 1967.

2 - ALLISON A.C. and YOUNG
Uptake of dyes and drugs by living cells in culture.
Life Sci. 3, 1407-1414, 1964.

3 - ALVING A.S., EICHELBERGER L., CRAIGE B. Jr., JONES R. Jr., WHORTON C.M. and PULLMAN T.M.
Studies on the chronic toxicity of chloroquine (SN-7618).
J. Clin. Invest. 27 : 60-65, 1948.

4 - ATTALI Pierre
Contribution à l'étude du métabolisme glucidique au cours du paludisme expérimental à Plasmodium Berghei.
Thèse - Série n° 3 - Alger, 3 Juillet 1961.

5 - AUDINOT M., BARRET C., HERBERT M., PICHAT L.
Les contrôles de pureté et la conservation des molécules marquées.
C.E.N. - Saclay - Service des Molécules Marquées
Extrait du BIST n° 118 - 1967.

6 - BECQUREL H.
C.R. Acad. Sc. 1896, 122, 420-421.

7 - BEIERWALTES W.H., LIEBERMAN L.M., VARMA V.M. et al.
Scintillation scanning of malignant melanomas with radio-iodinated quinoline derivatives.
J. Lab. Clin. Med. 72 : 485-494, 1968.

8 - BENAKIS A.
Laboratoire du métabolisme des médicaments - Ecole de Médecine, Genève.
Techniques de la scintillation liquide appliquées à l'étude du métabolisme des médicaments.
Symposium sur les progrès des Techniques nucléaires en Pharmacodynamie.
Saclay - INSTN - 11-13 Mars 1970.

9 - BERNSTEIN H., ZVAIFLER N., RUBIN M. et al.
Ther ocular deposition of chloroquine.
Invest. Ophthal. 2 : 384-392, 1963.

10 - BLANC D. et AMBROSINO G.
Eléments de physique nucléaire
Masson et Cie - Paris 1967.

11 - BLANQUET P., MORETTI J.L., SAFI N., VERIN Ph.
Utilisation d'un nouveau vecteur dans le diagnostic des mélanomes.
Journal de biologie et de médecine Nucléaire.
A.T.E.N. - Tome V - n° 32, 1970.

12 - BLISS C.I. et CATTEL Mc K.
Biological assay.
Ann. Rev. Physiol. 1943, 5, p. 479.

13 - BLOSS M.S.
Melonoma detection with radioiodoquine.
J. Nucl. Med. 9 : 492-493, 1968.

14 - BOYD G.A.
Autoradiography in biology and medecine.
Acad. Press. New York, 1955.

15 - BRODIE B.B., UDENFRIEND S., DILL W. and CHENKIN T.
The estimation of basic organic compound in biological materials.
Estimation by conversion to fluorescent compounds.
J. Biological Chem. 168 : 299-309, 1947.

16 - C.D. FITCH
Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 64, 1181 (1969).

17 - CARMACK M., BULLITT O.H. Jr., HENDRICK G.R., KISSINGER L.W. and VON L.
Synthesis of 4 - (4'amino-1'-méthylbutyl amino) -7- chloroquinoline and some 4 (4'-monoalkyl amino-1'-méthylbutyl-amino) -7- chloroquinolines.
J. Am. Chem. Soc. 68 : 1220-1225, 1946.

18 - CAVIER R.
Parasitologie
SEDES Ed. (5 pp. Sorbonne) Paris, 1970.

19 - CHALAMBAS PLESSAS
Etude de la liaison des médicaments avec les protéines plasmatiques à l'aide des traceurs radioactifs.
Thèse n° 1490 de l'Université de Genève, 1969.

20 - CHARLES M. BOYD, WILLIAM H., BEIRWALTES, LIONEL M. LIEBERMAN and TERRY J. BERGSTRON
^{125}I-Labeled chloroquine analog in the diagnosis of ocular melanomas.
J. of Nuclear Medecine. Volume 12 n° 9, p. 601-605, 1971.

21 - CHESNEY E.W., MC JAMES M. SHEKOSKY, P.H. HERNANDEZ
Metabolisme of chloroquine 3-^{14}C in the rhesus monkey.
Biochem. Pharmacology - vol. 16, pp. 2444-2447
Pergamon Press - G.B., 1967.

22 - CHEVREMONT M.
Cytologie et Histologie.
Editions Desoer 1955-1956 - Liège.

23 - CHIVOT J.J.
Les colloïdes radioactifs dans l'exploration fonctionnelle du système réticulo-endothélial.
Rapport CEA R 3240 - C.E.N. Saclay, 1967.

24 - CIAK J. and HAHN F.E.
Science 151, 347, 1966.

25 - CIAK J. and HAHN F.E.
Science 156, 655, 1967.

26 - CLARK J. and HAHN F.E.
Chloroquine : Mode of action.
Science 151 : 347-349, 1966.

27 - COHEN Y.
L'emploi des isotopes en pharmacologie.
Thérapie, 1957, XII, 708-736.

28 - COHEN Y.
Le contrôle des radioéléments artificiels à l'usage médical en France.
Ann. Pharm. Fr. 1959, 17, 250.

29 - COHEN Y.
Bases expérimentales de l'emploi des colloïdes radioactifs en thérapeutique.
Prod. Probl. Pharm. Fr., 1961, 16, 1-10.

30 - COHEN Y.
Une nouvelle classe de médicaments, les isotopes radioactifs.
Prod. Probl. Pharm. Fr. 1962, 17, 3-18.

31 - COHEN Y.
Méthodes biologiques d'essai des radio-colloïdes et leur valeur.
J. Radiol. Electrol. Med. Nucl. Fr. 1965, 46, 5, 259-260.

32 - COHEN Y.
Les radioéléments en pharmacocinétique.
Bulletin d'informations Scientifiques et Techniques du Commissariat à l'Energie Atomique n° 147 - Avril 1970.

33 - COHEN Y., COSTEROUSSE O., CHIVOT J.J.
Pharmacodynamie des colloïdes radioactifs.
Minerva Nucl. Ital., 1964, 8 (6), 357-366.

34 - COHEN Y., DELASSUE H.
Modifications de la méthode d'autoradiographie de S. Ullberg sur coupes de souris entières.
C.R. Soc. Biol. Fr. 1959, 153, 2, 300-304.

35 - COHEN Y., INGRAND J., CARO R.A.
Kinetics of the disappearance of gelatin Protected radiogold colloïd from the blood stream.
Intern. Journal of Applied radiation and Isotopes.
1968, Vol. 19, pp. 703-705, Pergamon Press.

36 - COHEN Y., WEPIERRE J., PONTY D.
Fixation du chrome 51 sur les fractions protéiques du sérum sanguin.
In. Fellinger K., Höfer R. Radioktive Isotope in Klinik und Forschung.
Band VI - Urabn und Schwarzemberg - Munchen 1965.

37 - CONKLIN K.A. and CHOU S.C.
Antimalarials : Effects on in vivo and vitro protein synthesis.
Science. Vol. 170, n° 3963, 1970 (American Assoc. For Adv. of science).

38 - COVELI, G.S., COATNEY G.R., FIELD J.W. and JASWANT SINGH
La chimiothérapie du paludisme.
OMS - Genève 1956.

39 - DAVEY D.G.
Chemotherapy of malaria.
British. Med. Bulletin 8, 37-46, 1951.

40 - DECOURT Ph.
Principes de l'étude pharmacologique des antipaludiques.
Actualités Pharmacologiques 1950 - Tome II, page 57.

41 - DOBSON E.L., GOFMAN J.W., JONES H.B., KELLY L.S., WALKER L.A.
Studies with colloïds containing radioisotopes of yttrium, zirconium, columbium and Lanthanum.
J. Lab. Clin. Med. U.S.A. 34, 305-312.
U.S.A. 1949.

42 - DONALDSON H.H.
In the rat.
pp. 181-297 - Wistar - Institute Philadelphia, 1924.

43 - DUMAS J.
Les animaux du laboratoire.
Collection Institut Pasteur - Editions Médicales Flammarion, 1953, Paris.

44 - DUMAS J. et BORDET P.
Bactériologie médicale.
Collection méd. à révision annuelle 1951 - pp. 608-614..

45 - DROZ B., LARRA F.
C.E.A. - Département de Biologie - C.E.N. Saclay.
Apport de la radioautographie aux études pharmacodynamiques.
Symposium sur les Progrès des techniques nucléaires en pharmacodynamie - I.N.S.T.N. 11-13 Mars 1970 - Saclay.

46 - EHRLICH P. et SHAVA HATA
La chimiothérapie expérimentale des Spirilloses. 1911.

47 - FABIANI G., ORFILA J.
Caractères généraux du paludisme expérimental de la Souris blanche par Plasmodium berghei.
Ann. Institut Pasteur 1954, 87, Juillet, 38-45.

48 - FALLOT P.
Mesure des rayonnements β et γ dans les échantillons biologiques.
Cours de Radiobiologie. Session 1957-1958. B.I.

49 - FALLOT P. et LAINE BOSZORMENYL M.
Détection par scintillation en milieu liquide et ses applications biologiques.
Commissariat à l'Energie Atomique - Département de Biologie - C.E.N. Saclay - Cours de Radiobiologie, Session de 1967-1968.

50 - GAILLARD H. et LAPIERRE J.
Modifications hématologiques dans le paludisme à Plasmodium berghei chez la Souris.
Bull. Soc. Path. Exotique 1950, 43, 317-320.

51 - GAILLARD H. et LAPIETTE J.
Recherche sur le développement initial de Plasmodium berghei.
Bull. Soc. Path. Exotique 1950, 43.

52 - GARNHAM P.C., Mc WILSON WARREN C. and KILLICK-KENDRICK R.
The action of "Terramycin" on the primary exoerythrocytic development of Plasmodium vivax and Plasmodium cynomolgi ceylonensis.
The Journal of Tropical Medecine and Hygiene.
Vol. 74, n° 2, 1971.

53 - GRUNDMAN M.P., VRUBLOVSKY and MIKULIKOVA I.
Tissue distribution of chloroquine in the Rabit.
Arch. Intern. Pharmacodyn. 184, 366-373 (1970).

54 - GUTTMAN P. and EHRLICH P.
Ueber die wirkung des methylenbrau bei Malaria.
Berl. Klin. Wschr. 1891, 28, 953-956.

55 - HUGQUNENQ L. et FLORENCE G.
Principes de pharmacodynamie.
Masson et Cie, Editeurs - Paris 1928.

56 - KALLMANN H. et FURST
Fluorescende of solutions bombarded with high energy radiations
(Energy transport in liquids).
Phys. Rev. 79, 857 (1950).

57 - KALLMANN et FURST
The basic processus occuring in the liquid scintillator.
Proceeding of a conference held at Northwestern University P-3,
aug. 20/22 (1957).

58 - KURODA K.
Detection and distribution of chloroquine metabolites in human tissues.
J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics. Vol. 137, n° 2, 1962.

59 - KOSSINET PERTUKA
Autoradiographie appliquée à l'hématologie - 1960.

60 - KRAMER P. and NATUSIK J.E.
Location of chloroquine binding sites in Plasmoding berghei.
Biochemical Pharmacology Vol. 20, pp. 1619-1626, Pergamon Press, 1971.

61 - LACASSAGNE A. et LATTES J.S.
C.R. Acad. Sciences 1924, 178, 488-490.

62 - LISON L.
Statistique appliquée à la biologie expérimentale.
Gauthiers-Villard, 1968.

63 - MACOMBER P.
Science, 152, 1374 (1966).

64 - MAURICE M.
Mathologie exotique.
Editions Doin, 1965.

65 - MERCADO T.L., COANEY G.R.
The cours of the blood induced plasmodium berghei infection in white mices.
J. Parasitol., 1951, 37, 479-483.

66 - MOST H., LONDON I.M., KANE C.A., LAVIETES P.H., SCHROEDER E.F., and HAYMAN J.M. Jr.
Chloroquine for treatment of acute attacks of vivax malaria.
J. Amer. Med. Ass. 131, 963-967, 1946.

67 - O'BRIEN R.L., HAHN P.E.
Chloroquine structural regencements for binding to desoxyribonucleic acid and malariae regencement.
Antimicrob. Agent and Chemoth. 315-320, 1965.

68 - Parasitologie du Paludisme.
OMS - Rapports techniques n° 433 - Genève 1969.

69 - PICHAT L.
Chef du Service des Molécules Marquées - C.E.N. Saclay.
Préparation de produits pharmacologiques marqués par les radioisotopes : ^{14}C, ^{3}H, ^{35}S. Problèmes de synthèses, purification et stabilité.
Symposium sur les progrès des techniques nucléaires en pharmacodynamie.
Saclay I.N.S.T.N. - 11 au 13 Mars 1970.

70 - POLET H. and CHARLES F. BARR
(Department of Hematology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.).
Uptake of chloroquine 3 ^{3}H by plasmodium knowlesi in vitro.
J. of Pharmacology and experimental therapeutics vol. 168, n° 1, U.S.A. 1969.

71 - POLET H., and CHARLES F. BARR
Chloroquine and dihydroquinine. In vitro studies fo their antimalarial effect upon Plasmodium knowlesi.
J. Pharmacol. exp. Ther. 164, 380-386, 1968.

72 - QUEVAUVILLER A. et LOUW L.W.
Etude du Plasmodium berghei chez la Souris blanche de Laboratoire.
Morphologie ; évolution dans le sang et les organes. Réactions histopathologiques.
Biologie médicale, 1955, 44, n° 3, 347-374.

73 - RANDERATH K.
Chromatographie sur couches minces.
(Traduit de l'allemand par N-Guyen-Dang-Tam). Gauthier-Villars, Paris 1964.

74 - READ W.K., D.V.M. PHD and W.W. BAY, D.V.M. PHD
Basic cellular lesion in chloroquine toxicity.
Laboratory investigation - Department of veretinary Pathology, Collège of veterinary Medecine and Texas Agricultural Experiment station.
Texas A.M. University, College station. Texas 77843, vol. 24, n° 3, 246, 1971.

75 - ROGERS A.W.
Techniques of autoradiography.
Elsevier Publi. Cy. Amsterdam, 1967.

76 - ROUSSELET J.P.
Contribution à l'étude pharmacologique du transport des colloïdes d'or radioactif par le sang et les exsudats séreux.
Rapport CEA R 3064 du C.E.N. Saclay, 1967.

77 - SARRAZIN G.
Modification de l'activité expérimentale de certains médicaments dans le paludisme des rongeurs à Plasmodium berghei.
Thèse - Faculté de Pharmacie, 1969.

78 - SCHNEIDER J.
Etude pharmacologique et thérapeutique des antipaludiques de synthèse.
1951. Tome III, p. 105.

79 - SCHNITZER R.J., FRANCK HAWKING
Experimental Chemotherapy - Volume IV, pages 448, 451, 458, 459, 466.
Academic Press, London, 1966.

80 - SCHNITZER R.J., FRANCK HAWKING
Experimental Chemotherapy, Volume V, 18-19.
Academic Press, London 1967.

81 - SCHULEMANN W.
Synthetic antimalarial preparations.
Proc. Roy. Soc. Med. 1932, 25, 897-905.

82 - SERGENT E.
Observations d'infestation latente d'emblée avec prémunition corrélative dans le paludisme expérimental à Plasmodium berghei du Rat blanc.
C.R. Acad. Sci., 1954, 239, 524 525.

83 - SERGENT E., PONCET A.
Etude expérimentale du paludisme à Plasmodium berghei. Stade d'infestation latente métacritique.
Arch. Inst. Pasteur d'Algérie, 1955, 33, n° 3, 195-222.

84 - SERGENT E., PONCET A.
Etude expérimentale du paludisme des rongeurs à Plasmodium berghei. Résistance innée.
Arch. Instit. Pasteur d'Algérie, 1955, 33, n° 4, 287-306 .

85 - SERGENT E., PONCET A.
Etude expérimentale du paludisme des rongeurs à Plasmodium berghei. Résistance acquise.
Arch. Instit. Pasteur d'Algérie, 1956, 34, n° 1, 1-51.

86 - SERGENT E., PONCET A.
Note sur la résistance innée à Plasmodium berghei des gerbilles de l'Afrique du Nord.
Arch. Institut Pasteur d'Algérie 1956, 34, n° 4, 494-495.

87 - SERGENT E., PONCET A.
Résistance innée du Hérisson au paludisme des rongeurs à Plasmodium berghei.
Arch. Instit. Pasteur d'Algérie, 1957, 35, n° 3, 203.

88 - STUMPF W.E. et ROTH L.J.
Nature, 1965, 205, 712-713.

89 - VALETTE G.
Etude de la fixation de la quinine sur les paramécies au moyen de l'examen microscopique de la fluorescence.
C.R. Acad. Sc. 1935, 201-681.

90 - VALETTE G.
L'essai pharmacologique et ses limites.
Bulletin de l'Association des pharmaciens de Clermont-Ferrand, 1964, n° 66 213.

91 - VALETTE G.
Précis de Pharmacodynamie.
Masson et Cie, 1969.

92 - VALETTE G. et ROLLE R.
Etude de l'action de la quinine sur les amibes : Pénétration et toxicité.
C.R. Ac. des Sciences, 1938, 207 - 1071.

93 - VALETTE G., COHEN Y.
Symposium sur les progrès des techniques nucléaires en pharmacodynamie.
Saclay I.N.S.T.N., 11-13 Mars 1970.

94 - VINCKE I., LIPS M.
Un nouveau Plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo, Plasmodium berghei.
Ann. Soc. Biol. Med. Tropicals, 1948, 29, 97-106.

Manuscrit reçu le 15 mai 1972

TABLE DES MATIERES

- INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS

- CHAPITRE I
  - Le Plasmodium
  - Rappels
  - Plasmodium Berghei
  - Espèces animales réceptives au Plasmodium Berghei
    1. L'agent pathogène : Plasmodium Berghei
    2. Réceptivité des Rongeurs au Plasmodium Berghei : causes qui interfèrent quant à la modification de cette réceptivité
    3. Symptômes et évolution du paludisme chez la Souris et le Rat
       a) chez la Souris
       b) chez le Rat
    4. Obtention de la souche de Plasmodium Berghei. Méthodes d'impaludation des animaux d'expérience.

- CHAPITRE II
  - Méthodes d'étude des agents pharmacologiques actifs sur les hématozoaires du paludisme et sur les tissus de l'hôte.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

- CHAPITRE III
  - Méthodes expérimentales utilisées dans nos travaux.

- CHAPITRE IV
  - Les diverses chloroquines marquées au carbone 14 et à l'iode 131.
  - Leur stabilité, leur analyse radiochimique.

- CHAPITRE V - Détermination de la DL 50 de la chloroquine ^{14}C chez la Souris normale et impaludée.

- CHAPITRE VI - Distribution de la chloroquine ^{14}C chez la Souris normale et chez la Souris impaludée en période d'état, in toto.
Injection IV à des temps 1 heure, 6 heures, 24 heures et 48 heures.

- Autoradiographie.

- CHAPITRE VII - Distribution de la chloroquine ^{14}C dans le foie et la rate de Rats impaludés aux temps 24 heures et 48 heures.

- CHAPITRE VIII - Etude quantitative de la distribution tissulaire chez la Souris normale et chez la Souris impaludée, en période d'état aux temps 1 heure, 6 heures et 48 heures. Etude de la fixation en fonction de l'évolution de l'impaludation : Phase exoérythrocytaire et phase érythrocytaire. Scintillation liquide.

- CHAPITRE IX - Distribution de la chloroquine ^{14}C :

1. Dans le sang du Rat normal et du Rat impaludé en période d'état.
2. Dans le sang de la Souris normale et de la Souris impaludée en période d'état, in vivo.
   Autohistoradiographie.

- CHAPITRE X - Métabolisme et excrétion urinaire de la chloroquine ^{14}C chez le Rat normal et chez le Rat impaludé.

- CHAPITRE XI - Cinétique sanguine de la chloroquine ^{14}C chez le Rat normal et chez le Rat impaludé.

- CHAPITRE XII - Discussion générale

- CONCLUSIONS

Vu et Permis d'Imprimer
PARIS, le 8 mars 1972
Le Vice-Président de l'Université
de PARIS XI

Y. COHEN